Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Prof. Dr. med. H. Remmer

TRANSPORT VON G-STROPHANTHIN UND DIGITOXIN DURCH DIE MEMBRAN ISOLIERTER LEBERZELLEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
THADDÄUS-ANTON WIEDMANN
aus Neufra bei Riedlingen

1981

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Prof. Dr. med. H. Remmer

TRANSPORT VON G-STROPHANTHIN UND DIGITOXIN DURCH DIE MEMBRAN ISOLIERTER LEBERZELLEN

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
THADDÄUS-ANTON WIEDMANN
aus Neufra bei Riedlingen

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

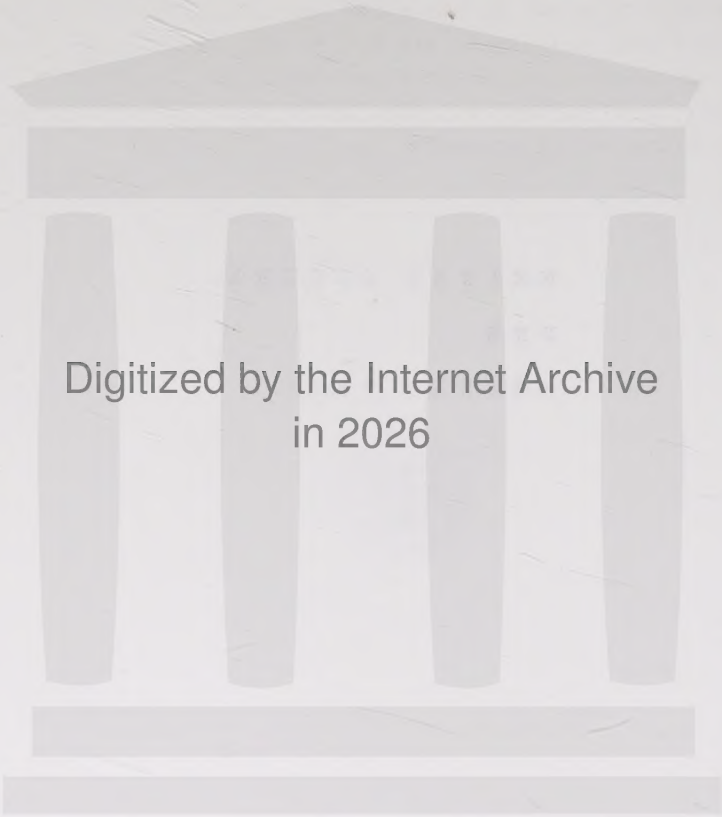
Dekan: Professor Dr. med. H. Haselmann
1. Berichterstatter: Professor Dr. rer. nat. E. Pfaff
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. H.-J. Ruoff

Druck: **aku-Fotodruck GmbH,** Eckbertstraße 19, 8600 Bamberg

M E I N E N E L T E R N

U N D

M E I N E R F R A U


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548919_0020

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden von April '78 bis Dezember '78 am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen unter der Leitung von Prof.Dr.E.Pfaff durchgeführt.
Herrn Dr.M.Schwenk möchte ich für die Überlassung des Themas, für seine unermüdliche Bereitschaft zur Diskussion und für die Übermittlung der Methoden aus der dynamischen Biochemie danken. Herrn Prof.Remmer bin ich zu Dank verpflichtet für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes. Mein besonderer Dank gilt Frau B.Frank für ihre Hilfe bei der technischen Durchführung der Experimente.

INHALTSVERZEICHNIS

			Seite
A.		EINLEITUNG	1
B.		MATERIAL UND METHODEN	5
	1.	Material	5
	2.	Tiere	5
	3.	Isolierung der Leberzellen	6
	4.	Prüfen der Zellvitalität	7
	5.	Inkubation der Leberzellen	7
	6.	Zentrifugalfiltration	8
C.		ERGEBNISSE	
I.		AUFNAHME VON STROPHANTHIN IN ISOLIERTE LEBERZELLEN	9
	1.	Zeitlicher Verlauf	9
	2.	Sättigbarkeit	9
	3.	Kompetitive Hemmung	12
	3.1.	Glucose, Rhamnose	12
	3.2.	Taurocholat	15
	3.3.	Digitoxin	15
	4.	Hemmung durch 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB)	20
	5.	Einfluß von Na^+, K^+, Mg^{++}, Ca^{++}	20
	6.	Einfluß des pH	22
	7.	Einfluß der Temperatur	22
	8.	Einfluß von Antimycin A (AA)	25
	9.	Einfluß der Vorinkubation	27
	10.	Austauschdiffusion	27
	11.	Transmembraneffekt	28
	12.	Mechanische Zellschädigung	31
	13.	Einfluß von Äthanol	33

Seite

II. ABGABE VON STROPHANTHIN AUS ISOLIERTEN LEBERZELLEN 33

1. Zeitlicher Verlauf 33
2. Einfluß von 2,4-Dinitrofluorbenzol und Antimycin A 35
3. Einfluß der Temperatur 38
4. Metabolismus 38
5. Intrazelluläre Bindung 39
5.1. Mitochondrien 39
5.2. Cytoplasma 39
5.3. Zellmembran 40
6. Verteilungskoeffizient 40

III. AUFNAHME VON DIGITOXIN IN ISOLIERTE LEBERZELLEN 41

1. Olivenöl/Wasser-Verteilung von Digitoxin 41
2. Zeitlicher Verlauf der Aufnahme 41
3. Einfluß der Temperatur 44
4. Einfluß von DNFB, AA, K^+, und Strophanthin 44
5. Wird Digitoxin metabolisiert? 44

IV. EINFLUSS VON HERZGLYKOSIDEN AUF DIE ZELLVITALITÄT 47

1. Einfluß auf die Zellatmung 47
2. Einfluß auf die Anfärbbarkeit mit Trypanblau 47

D. DISKUSSION

I. STROPHANTHIN: MEMBRANBINDUNG ODER MEMBRANTRANSPORT? 49

1. Was spricht für eine Aufnahme in die Zelle? 50
1.1. Ausstrom von Strophanthin nach Zellschädigung 50

Seite

1.2 Energieabhängigkeit 51

1.3. Berechnung der Zahl hypothetischer Bindestellen 51

1.4. Metabolismus 52

2. Gibt es Hinweise für eine Membranbindung? 52

II. WELCHE AUSSAGEN SIND ÜBER DEN TRANSPORTMECHANISMUS MÖGLICH? 53

1. Rezeptorbindung 54

2. Translokation 54

3. Dissoziation des Komplexes 56

4. Ursachen der Akkumulation 57

5. Passive Abgabe von Strophanthin 59

III. WARUM WERDEN STROPHANTHIN UND DIGITOXIN VERSCHIEDEN TRANSPORTIERT? 60

IV. KÖNNTE ALKOHOL DIE PHARMAKOKINETIK VON HERZGLYKOSIDEN BEEINFLUSSEN? 61

E. ZUSAMMENFASSUNG 63

F. LITERATURVERZEICHNIS 64

A. EINLEITUNG

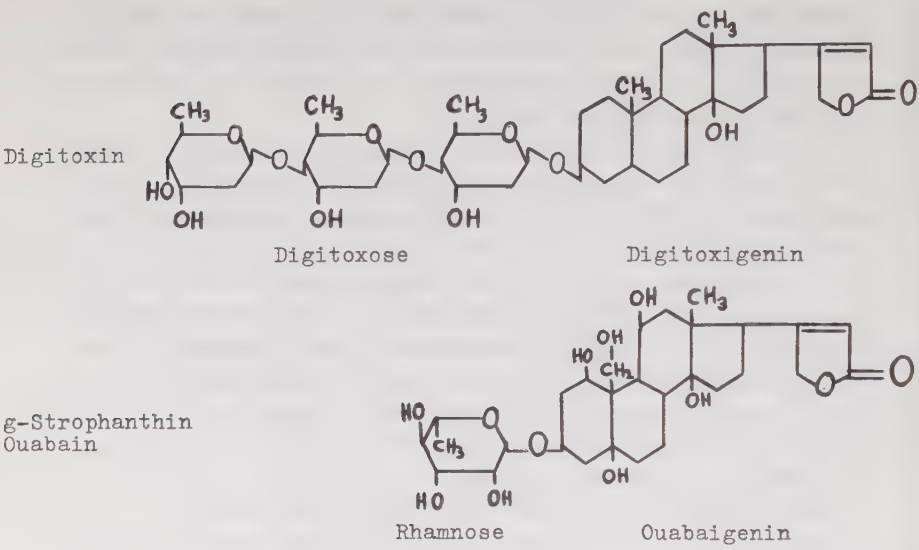
Die Herzglykoside gehören zu einer großen Gruppe von Verbindungen, die durch eine charakteristische chemische Struktur (vgl. Formelschema S.2) und eine typische Wirkung auf die Herzdynamik und -rhythmik gekennzeichnet sind. In toxischer Dosis verursachen sie Erbrechen, Durchfall und schließlich Herzstillstand, in therapeutischer Dosierung dagegen bringen sie vielen Patienten durch Pulsverlangsamung und -kräftigung Erleichterung oder gar Heilung.

G-Strophanthin zeigt, im folgenden 'Strophanthin' abgekürzt, oral verabreicht, wenig Wirkung. A.FRÄNKRL (1) begann deshalb 1906 mit der Einführung der intravenösen Strophanthin-Therapie. Die enterale Resorption liegt nach STORZ (2) zwischen 0,46% und 4,4%. Eine mögliche Erklärung für die geringe intestinale Resorption von Strophanthin brachte LAUTERBACH (3) mit der Beobachtung, daß Strophanthin im Darm nicht nur resorbiert wird, sondern sogar vom Blut in das Darmlumen sezerniert werden kann. Dagegen wurde die weit effektivere Resorption von Digitoxin (annähernd 100%) einem aktiven Transport im Darm zugeschrieben (4).

Neben dem Darm fällt auch der Leber eine wichtige Funktion für die Pharmakokinetik der Herzglykoside zu : denn Digitoxin wird beim Menschen in beträchtlichem Umfang (6 - 13), das Strophanthin (cf. 5) in kleinerem Maße in der Leber metabolisiert, und beide Glykoside werden zu erheblichem Anteil von ihr in die Galle abgegeben (5, 14, 15). In der Rattenleber ist die Metabolisierung geringer als beim Menschen, die Ausscheidung höher (5). Die niedrige Toxizität von Herzglykosiden in der Rattenleber wurde von FARAH (16) auf die geringe biologische Verfügbarkeit durch die starke biliäre Elimination zurückgeführt. FARAH zeigte als erster, daß die Aufnahme von Strophanthin in Leberschnitte energieabhängig erfolgt.

Die Tatsache, daß Strophanthin in der Rattenleber fast

nicht metabolisiert wird, ist eine besonders günstige Voraussetzung für kinetische Untersuchungen. Daher hat Strophanthin als Repräsentant ungeladener, wasserlöslicher Fremdsubstanzen geradezu Modellcharakter für Transportstudien.



Chemische Konstitution von g-Strophanthin und Digitoxin

So ergänzetn KUPFERBERG und SCHANKER (17) die Beobachtungen von FARAH, indem sie zeigten, daß die Aufnahme von Strophanthin in Leberschnitte einer Sättigungskinetik folgt. Sie stellten außerdem fest, daß die Aufnahme auch durch andere Steroide gehemmt wird (18) und schlossen daraus, daß möglicherweise verschiedene Steroidmoleküle über einen gemeinsamen Mechanismus in die Leber aufgenommen werden können.

Allerdings haben Leberschnitte den Nachteil, daß nicht unterschieden werden kann, ob Strophanthin tatsächlich vom

Medium in die Zellen aufgenommen wird, oder ob der konzentrierende Schritt durch aktive Sekretion in noch erhaltene Canaliculi erfolgt. Dieses Argument führten MEIJER et al. (19) an. Sie fanden bei gleichzeitiger Infusion von Dehydrocholat und ^{3}H-Strophanthin eine verminderte Strophanthinsekretion in die Galle und zogen aus ihren Beobachtungen den Schluß, daß Steroide nicht um die Aufnahme in die Leberzelle, sondern um die Aufnahme in die Galle konkurrieren.

Eine ganz neue Arbeit von EATON und KLAASSEN aus dem Jahre 1978 (20) zeigte nun aber unter Verwendung isolierter Leberzellen eindeutig, daß die Aufnahme in die Zelle ein energieabhängiger und sättigbarer Prozess ist.

Bei den vorliegenden Transportstudien wurden ebenfalls isolierte Leberzellen verwendet. Isolierte Leberzellen haben gegenüber anderen experimentellen Modellen den großen Vorzug, daß die Anfangsgeschwindigkeit des Transportes durch kinetische Untersuchungen genau bestimmt werden kann ohne die Verfälschungen, die beim ganzen Organ oder bei Organschnitten durch die komplexe Morphologie und systemischen Einflüsse zustande kommen. Zudem können von den Zellen eines einzigen Tieres eine große Zahl kinetischer Daten erarbeitet werden.

Die Einführung isolierter Leberzellen hat in den letzten Jahren wesentliche Erkenntnisse zur spezifischen Aufnahme von konjugierten (21) und unkonjugierten (22) Gallensäuren und konjugierten (22) und unkonjugierten (23, 24) Steroidhormonen und Strophanthin aus dem Blut in die Leber erbracht. Es hat sich überraschend gezeigt, daß zumindest Gallensäurem nicht nur aktiv in die Zellen aufgenommen werden, sondern auch aktiv aus isolierten Zellen abgegeben werden können (25).

Allerdings stehen gerade in bezug auf den Transport der Herzglykoside noch viele Fragen offen. So ist ungeklärt, ob die Beeinflussung des Strophanthin-Transportes durch andere Steroide unspezifischer Natur ist, oder eine echte Kompetition um einen gemeinsamen Transportmechanismus darstellt. Ebenso

ist unbekannt, ob Strophanthin aktiv aus Zellen abgegeben werden kann. Schließlich ist die interessante Frage, ob für die hepatische Aufnahme von Strophanthin und Digitoxin ähnliche Unterschiede bestehen, wie für die enterale Resorption der Glykoside, noch gänzlich unbeantwortet.

Deswegen wurde in der vorliegenden Arbeit die Kinetik des Transportes von Strophanthin und Digitoxin an isolierten Leberzellen vergleichend untersucht. Dadurch soll die Arbeit einen Beitrag leisten zum besseren Verständnis der Rolle der Leber für die Pharmakokinetik der Herzglykoside.

B. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

G-^{3}H-Strophanthin (Ouabain), 16,4 Ci/mmol und (Carbonyl-^{14}C) Taurocholsäure, 50 mCi/mmol wurden von dem Radiochemical Centre (Amersham, England) bezogen. Carboxyl-^{14}C-dextran, MG 75 000, 1,3 mCi/g und Digitoxin-^{3}H (G7, 8 Ci/mmol) wurden bei NEN Chemicals (Dreieichenhain) gekauft, nicht-markiertes Strophanthin und Digitoxin bei der Firma Merck (Darmstadt), Collagenase (EC. 34. 24. 3) und Antimycin A wurden von Boehringer (Mannheim), Taurocholsäure und Trypanblau von Serva (Heidelberg), Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCP) von Calbiochem (Los Angeles, USA) geliefert. Silikonöle der Typen AR 200 und AR 20 wurden von Wacker Chemie (München) bezogen. Die α-L-Rhamnose (L(+)Rhamnose, 6-Deoxy-L-Mannose) wurde von SIGMA Chemie (München) geliefert, ebenso 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB). Das Leibovitz-Medium, ATP, Pyruvat und Succinat wurden von Boehringer (Mannheim) gekauft. Alle sonst üblichen Laborchemikalien stammen von der Firma Merck (Darmstadt).

2. Tiere

Für die Versuche wurden ausschliesslich männliche Sprague-Dawley Ratten von 200 - 250 g verwendet. Die Tiere wurden von der Tierzuchtanstalt Ivanovas, Kisslegg, bezogen. Sie erhielten Altromin-Futter und Wasser ad libitum. Die Tiere wurden nicht vorbehandelt.

3. Isolierung der Leberzellen

Die Leberzellen wurden nach der von BAUR et al. (26) modifizierten Methode von BERRY und FRIEND (27) isoliert. Das Versuchstier wurde in Äthernarkose geöffnet, die Leber vorsichtig herausgetrennt und über die v. portae mit einem Ca^{++}-freien Standardmedium bei 37°C im offenen System durchgespült (121 mM NaCl, 25 mM $NaHCO_3$, 5,9 mM KCl, 0,74 mM KH_2PO_4, 0,6 mM $MgSO_4$, 5 mM Glucose). Anschließend wird das isolierte Organ mit einem Medium perfundiert, das zusätzlich 0,05% Collagenase, 0,2 mM Pyruvat und 0,05 mM $CaCl_2$ enthält. Mit diesem Medium wird solange perfundiert, bis eine deutliche Auflockerung und Erweichung der Läppchenstruktur zu sehen ist, was in der Regel nach 10 - 20 min der Fall war. Die Perfusion muß jetzt in umgekehrter Richtung durch die v. cava superior fortgesetzt werden, da die Hauptgefäße durch die Collagenase brüchig und undicht geworden sind. Während der Perfusion mit Standardmedium und Enzymmedium, wurde mit 95% O_2 und 5% CO_2 begast. Nachdem die Collagenase 25 - 30 min auf den Zellverband eingewirkt hat, wird die Leber in ein O_2-Medium (137 mM NaCl, 5,2 mM KCl, 0,9 mM $MgSO_4$, 0,12 mM $CaCl_2$, 5 mM Glucose, 3 mM Phosphatpuffer, pH 7,2 und 0°C) überführt. Die äußere durchsichtige Kapsel wird vorsichtig abgezogen, so daß das lockere Gewebematerial ins O_2-Medium aufgenommen werden kann. Durch leichtes Schütteln mit der Hand werden die kleinen Zellklumpen zusätzlich mechanisch aufgelöst. Um das Bindegewebe von den Zellen abzutrennen, wird der gesamte Inhalt über einen Filterstoff (Porenweite 0,3 mm) gegeben. Das Filtrat wird 2 min lang bei 50 x g sedimentiert und anschließend zweimal mit demselben O_2- Medium gewaschen. In diesem Medium werden die Zellen bei 0°C als Vorratsuspension aufbewahrt.

Der Proteingehalt dieser Suspension wurde mit Biuret-Reagenz photometrisch bestimmt (28).

4. Prüfen der Zellvitalität

Die Vitalität der isolierten Leberzellen wurde unmittelbar nach der Präparation, entsprechend den Kriterien von BAUR et al. (26), überprüft. Dazu wurden 5 ul Zellen aus der Vorratsuspension mit 5 ul 0,2% Trypanblau, gelöst im O_2-Medium, angefärbt. Es wurden nur solche Präparationen verwendet, die im Mikroskop nicht mehr als 8% mit Trypanblau gefärbte Zellen aufwiesen. Die Zellatmung wurde an einer Clark-Sauerstoffelektrode mit Schreiber bei 37°C gemessen (29). Als Inkubat zur Messung der Zellgrundatmung wurde eine Suspension von 1 ml O_2-Medium und 50 ul Zellen gewählt. Unter Zugabe von 5 ul 200 mM Succinat - die intakte Zellmembran ist für Succinat impermeabel - sollte sich der Kurvenverlauf möglichst nicht ändern. Eine Abweichung von der Steigung der Grundatmung deutet auf geschädigte Zellen hin. Bei Zugabe von 5 ul 200 uM CCP als Entkoppler wird mehr O_2 verbraucht, sodaß aus dem Quotienten der Steigungen, CCP zu Succinat, der Atmunskontrollquotient, mindestens 1,3 betragen sollte.

5. Inkubation der Leberzellen

Die Zellen wurden im oben beschriebenen O_2-Medium inkubiert. Dazu wurde ein Aliquot aus der Vorratsuspension auf eine Proteinkonzentration von 1-2 mg Zellprotein/ ml Inkubat verdünnt. Zur Messung der zellulären Aufnahme wurde nach einer Vorinkubation von 10 min bei 37°C im Inkubationsgefäß (1 oder 2 ml Inhalt) die Transportreaktion durch Zugabe von 50 nCi ^{3}H-Strophanthin oder ^{3}H-Digitoxin und verschiedener Konzentrationen unmarkierter Substanzen gestartet.

Die Abgabekinetik wurde gemessen, indem die Leberzellen (4-6 mg Zellprotein/500 ul Inkubat)30 min bei 37°C mit markiertem (und unmarkiertem) Strophanthin beladen wurden und anschließend 100 ul dieser Suspension in 2 ml strophanthinfreies Medium überführt wurden. Aus diesem Gemisch wurden 200 ul abgenommen und zentrifugiert.

6. Zentrifugalfiltration

Durch die Zentrifugalfiltration (30) wird die Aufnahme bzw. der Abgabeprozess zeitlich terminiert. Dazu werden 200 ul aus der Inkubationsuspension entnommen und in ein vorbereitetes Zentrifugenröhrchen (0,5 ml Inhalt) pipettiert. Dieses Zentrifugenröhrchen enthält 50 ul 3M KOH, die von 100 ul einer Silikon-Öl-Schicht (Dichte 1,02 g/ml) bedeckt ist. Bei Zentrifugation in einer Beckman-Mikrofuge 152 werden die Zellen innerhalb von 1-2 sec durch die Silikon-Öl-Schicht in die 3M KOH geschleudert, wo sie denaturiert werden. Der Überstand ist nahezu zellfrei. Bei der Durchwanderung der Silikon-Öl-Schicht reißen die Zellen etwas Inkubationsmedium mit, das über die in diesem Volumen gelöste Menge an (Carboxyl-^{14}C)-Dextran bestimmt wurde. Um die Anteile an aufgenommener Substanz zu ermitteln, wird das Röhrchen durchschnitten und die Hälfte des Überstandes wie das ganze Sediment mit 6 ml Bray'scher Lösung versetzt, und die Radioaktivität in einem Berthold Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

C. ERGEBNISSE

I. AUFNAHME VON STROPHANTHIN IN ISOLIERTE LEBERZELLEN

1. Zeitlicher Verlauf

Strophanthin wird von isolierten Leberzellen aufgenommen. Der zeitliche Verlauf der zellulären Aufnahme aus einer 20 uM Strophanthinlösung ist in Abb. 1 dargestellt. Die Aufnahmegeschwindigkeit ist zu Beginn der Aufnahme am höchsten; sie fällt dann stetig ab, bis nach 20 min annähernd eine maximale intrazelluläre Konzentration erreicht ist. Der aufgenommene Anteil beträgt 34% der zugegebenen Menge an Strophanthin. Mit der Annahme, daß diese Menge auf das intrazelluläre wässrige Volumen (3 ul/mg Protein) gleichmäßig verteilt ist, entspricht dies einer 64-fachen Akkumulation.

Um Informationen über eine mögliche Sättigbarkeit zu erhalten, wurden in verschiedenen Inkubationsansätzen unterschiedliche Konzentrationen von Strophanthin (7 nM - 1 mM) verwendet. Die Abb. 2 zeigt den zeitlichen Verlauf der Strophanthinaufnahme bei verschiedenen Konzentrationen während 21 Minuten. Die Anfangsgeschwindigkeiten der Aufnahmen nehmen mit steigenden Konzentrationen zunächst zu, zeigen aber bei den höchsten angewendeten Konzentrationen die Tendenz zu einer Sättigung an. Höhere Konzentrationen von Strophanthin als 4 mM konnten wegen der begrenzten Löslichkeit im Puffermedium unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht hergestellt werden.

2. Sättigbarkeit

Zur besseren Darstellung der Sättigbarkeit und zur Ermittlung der kinetischen Konstanten der Strophanthinaufnahme wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der Abb. 2 im Lineweaver-Burk-Diagramm (31) aufgetragen. Die Auftragung ergibt eine Gerade

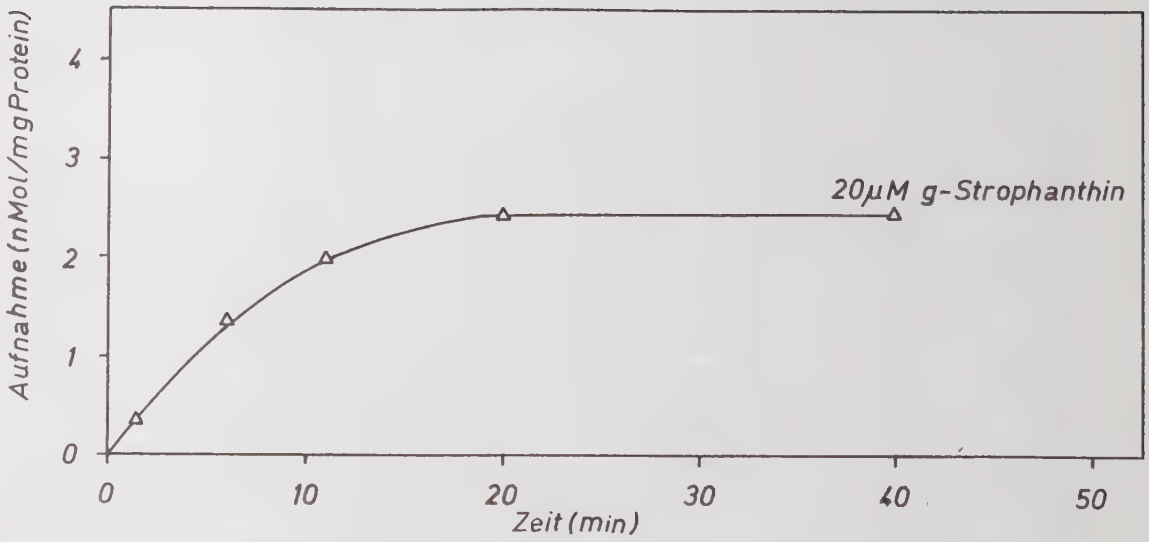


Abb. 1: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von Strophanthin in isolierte Leberzellen über 40 min

Leberzellen (2,5 mg Zellprotein/ml Inkubat) aus der Vorratsuspension wurden in 2 ml Medium bei pH 7,3 und 37°C unter Rühren 10 min vorinkubiert. Beim Zeitpunkt 0 wurden 10 ul Strophanthin zugegeben, sodaß eine Endkonzentration von 20 uM Strophanthin in der Inkubationsuspension entstand. 200 ul-Proben wurden entnommen und sofort bei 1,5 6 11 20 und 40 min abzentrifugiert.

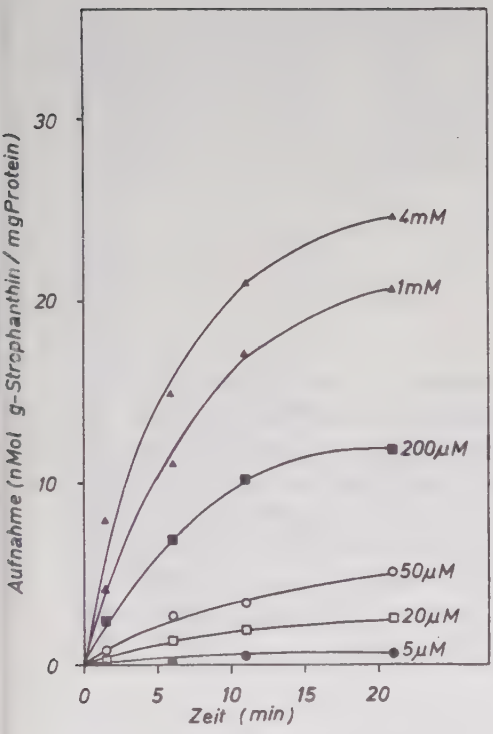


Abb. 2 Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von verschiedenen Strophanthin-Konzentrationen über 21 min.

Leberzellen(1,3 mg Zellprotein/ml Inkubat)aus der Vorratsuspension wurden in 1 ml Medium bei pH 7,3 und 37°C unter Rühren 10 min vorinkubiert. Beim Zeitpunkt 0 wurden 10 ul Strophanthin zugegeben, sodaß folgende Endkonzentrationen in den Inkubationsuspensionen entstanden: 5 uM (●), 20 uM (□), 50 uM (○), 200 uM (■), 1 mM (▲), 4 mM (△). Proben von 200 ul wurden entnommen und nach 1,5 6 11 und 21 min abzentrifugiert.

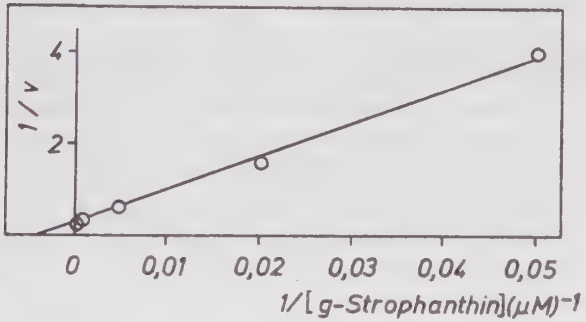


Abb. 3 Lineweaver-Burk Diagramm für die Aufnahme von Strophanthin

Die Werte für die Anfangsgeschwindigkeiten wurden aus der Abb. 2 entnommen. v ist in nMol/mg Protein x min angegeben.

(Abb. 3), die nicht durch den Nullpunkt geht. Dies weist auf eine sättigbare Reaktion hin. Es läßt sich ein K_m-Wert von 263 uM und v von 3,3 nMol/mg Protein x min ermitteln. In 3 Untersuchungen ergab sich ein $\overline{K}_m$ von (239 $\pm$ 61) uM und $\overline{v}_{max}$ von (3,1 $\pm$ 1) nMol/mg Protein x min.

3. Kompetitive Hemmung

Wie in der Einleitung bereits ausgeführt, besitzt das Strophanthinmolekül 2 Strukturkomponenten, einen Steroid- und einen Zuckeranteil. Sowohl von Glucose (32) als auch von Steroiden (21 - 25) ist bekannt, daß sie über spezifische Carrier in die Zellen transportiert werden. Hier soll untersucht werden, ob das Strophanthinmolekül über einen dieser Carrier transportiert wird. Ferner soll die mögliche Kompetition um die Aufnahme von Strophanthin durch andere strukturähnliche Herzglykoside untersucht werden.

3.1. Glucose, Rhamnose

Der Zucker L(+)-Rhamnose ist im Strophanthinmolekül α-glykosidisch am Steroidgerüst gebunden (vgl. Formelschema); es wäre denkbar, daß Strophanthin als Gesamtmolekül auf dem Transportweg für Zucker in die Zelle aufgenommen werden kann. Demzufolge sollte dann die Aufnahme des Strophanthinmoleküls durch den spezifischen Zucker hemmbar sein. Aufnahmestudien in Anwesenheit von Glucose und Rhamnose zeigten jedoch, daß selbst bei extrem hohen Konzentrationen dieses Zuckers (bis 200 mM) kein Hemmeffekt vorhanden war. Damit ist es unwahrscheinlich, daß Strophanthin über einen Zuckercarrier transportiert wird. Folglich muß noch die Hypothese geprüft werden, ob die Aufnahme über den Steroidcarrier erfolgt. Zu diesem Zweck wurde die Strophanthinaufnahme unter Zugabe verschiedener Taurocholatkonzentrationen gemessen.

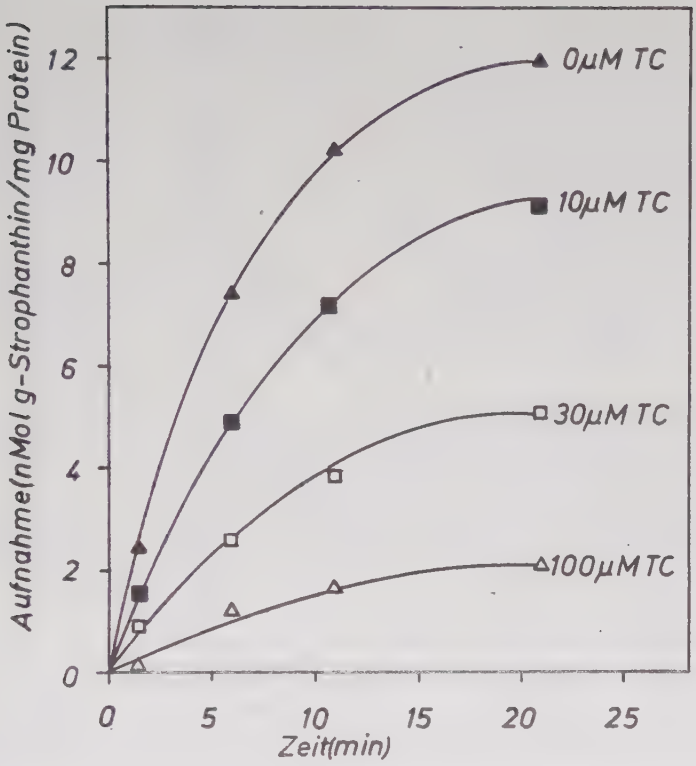


Abb. 4 Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von Strophanthin über 21 min und ihrer Hemmung durch verschiedene Taurocholat-Konzentrationen

Der Inhibitor wurde mit Strophanthin zur Inkubationsuspension(2,7 mg Protein/ml Inkubat)zugegeben. Die Probenentnahme erfolgte wie in Abb. 2 beschrieben. Es wurde eine 100 uM Strophanthin-Konzentration gewählt; die Taurocholat-Konzentrationen (TC) waren: Kontrolle 0 uM (▲), 10 uM (■), 30uM (□), 100 uM (△).

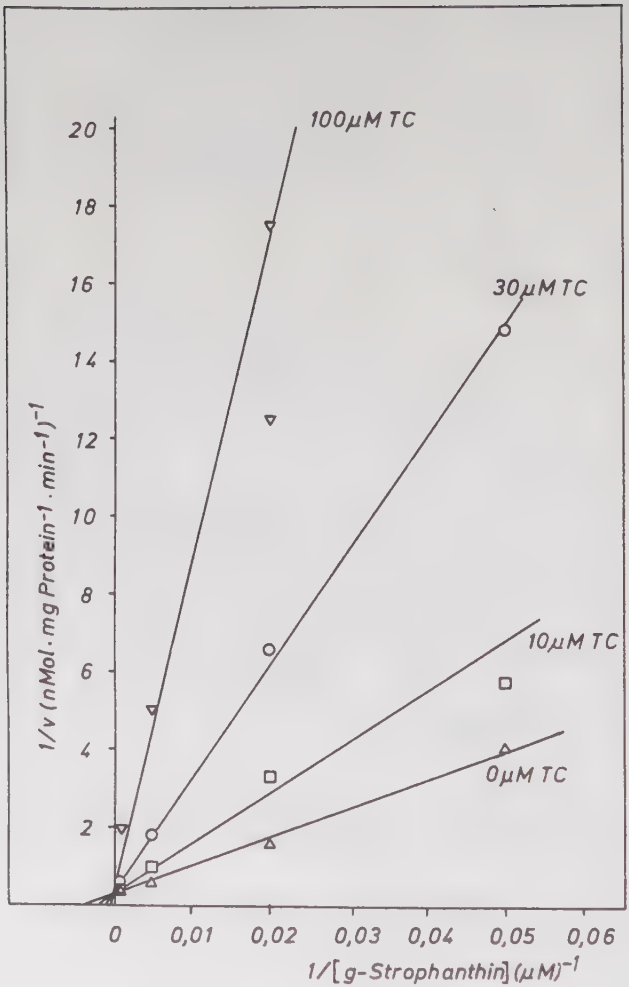


Abb. 5 Lineweaver-Burk Diagramm für die Aufnahme von Strophanthin und ihre Hemmung durch Taurocholat

Die Werte für die Anfangsgeschwindigkeiten wurden aus der Abb. 4 entnommen. Die Taurocholat-Konzentrationen (TC) waren: 0 uM (Δ), 10 uM (□), 30 uM (O), 100 uM (▽).

3.2. Taurocholat

In Abb. 4 ist die Aufnahme von Strophanthin, analog zu Abb. 1, dargestellt. Jedoch sind hier verschiedene Taurocholat-Konzentrationen zugegeben worden. Mit steigenden Taurocholat-Konzentrationen (0 uM - 100 uM) wird sowohl die Anfangsgeschwindigkeit von Strophanthin als auch die intrazelluläre Endkonzentration erniedrigt. Das Lineweaver-Burk Diagramm der Anfangsgeschwindigkeiten von Abb. 4 und zusätzlicher Werte bei anderen Strophanthin-Konzentrationen zeigen einen kompetitiven Hemmtyp (Abb. 5); einen Hinweis darauf gibt der gemeinsame Schnittpunkt der 4 Geraden.

Die Auftragung der reziproken Anfangsgeschwindigkeiten in Abhänigkeit steigender Taurocholat-Konzentrationen nach Dixon (33) ergibt einen gemeinsamen Schnittpunkt der Geraden mit einem K_i von 6,25 uM Taurocholat (Abb. 6). Auf Grund dieser Ergebnisse sollte man erwarten, daß die von SCHWARZ et al. beschriebene Hemmung der Taurocholat-Aufnahme durch Strophanthin (21) ebenfalls kompetitiv ist. Um dies zu prüfen, wurde in Abb. 7a - c die zeitliche Aufnahme verschiedener Taurocholat-Konzentrationen unter Zugabe von Strophanthin dargestellt. Es zeigt sich überraschend, daß im Bereich von 10 nM bis 100 uM Taurocholat immer eine Hemmung von 40% eintritt, d.h., daß die Hemmung nicht kompetitiv ist.

3.3. Digitoxin

Die Aufnahme von Strophanthin wird durch Digitoxin gehemmt. Über die Art der Hemmung gibt die Lineweaver-Burk Auftragung der Strophanthin-Aufnahme ohne Digitoxin und in Anwesenheit von 0,5 uM Digitoxin Auskunft (Abb. 8). Beide Kurven schneiden sich auf der Y-Achse, was auf einen kompetitiven Hemmtyp hinweist. Das Dixon-Diagramm in Abb. 9 veranschaulicht die Wirkung verschiedener Digitoxin-Konzentrationen auf die reziproke Aufnahmegeschwindigkeit von Strophanthin. Aus der Abbildung ist unmittelbar zu entnehmen, daß der Hemmeffekt von Digitoxin bei niedrigen Strophanthin-Konzentrationen viel größer ist als bei

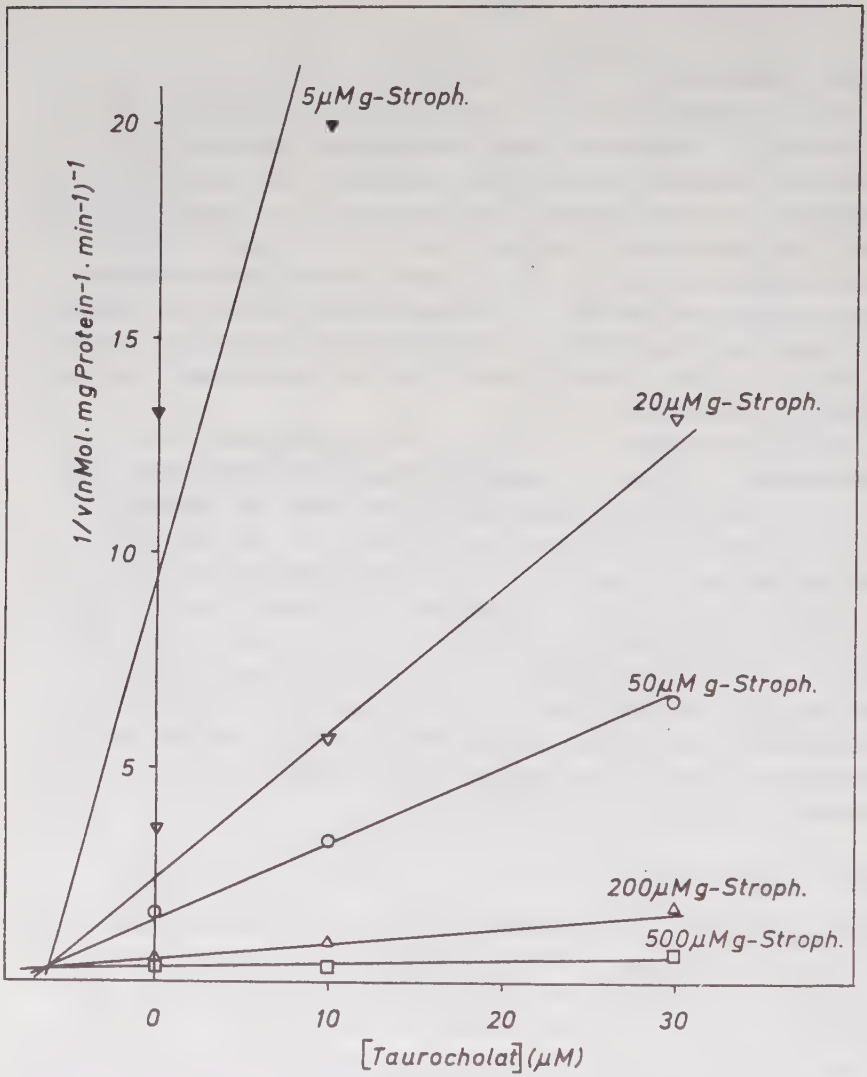
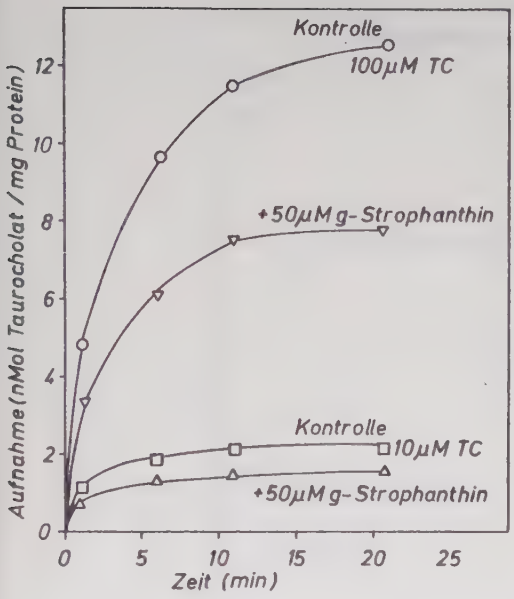
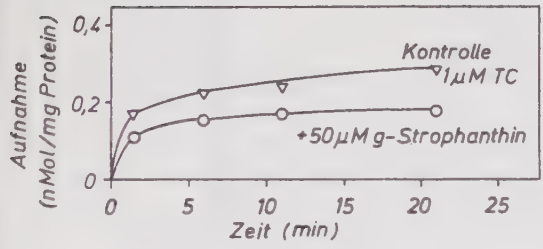


Abb. 6 Dixon-Diagramm der Strophanthin-Aufnahme zur Bestimmung des K_i von Taurocholat

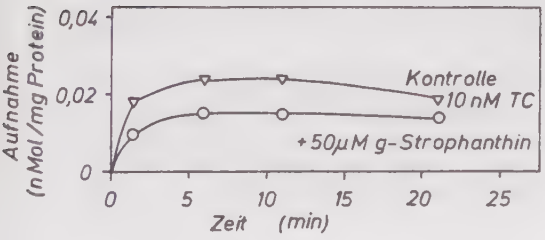
Die reziproken Anfangsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Strophanthin-Konzentrationen aus der Abb. 5 wurden gegen die Taurocholat-Konzentrationen aufgetragen. Die Strophanthin-Konzentrationen waren: 5 uM (▼), 20 uM (▽), 50 uM (○), 200 uM (△), 500 uM (□).



7c



7b



7a

Abb. 7a-c Zeitlicher Verlauf der Taurocholat-Aufnahme und ihrer Hemmung durch Strophanthin

Leberzellen(1,6 mg Zellprotein/ml Inkubat)wurden inkubiert wie in Abb. 2 beschrieben. 5 sec vor der Zugabe von Taurocholat wurde 50 uM Strophanthin als Inhibitor dem Inkubat hinzugefügt. In den 3 Darstellungen wurden folgende Taurocholat-Konzentrationen(TC) verwendet: 7a(unten)Kontrolle 10 nM (▽) und ihre Hemmung durch 50 uM Strophanthin (○), 7b(mitte) Kontrolle 1 uM (▽), gehemmt durch 50 uM Strophanthin (○), 7c(oben) Kontrolle 1o uM (□) und 100 uM (○), gehemmt durch jeweils 50 uM Strophathin (△) und (▽).

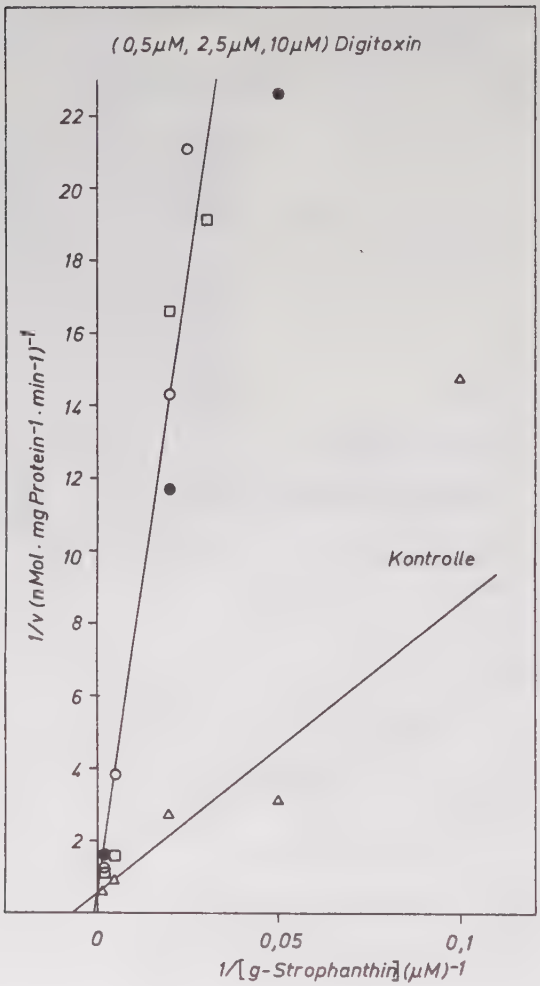


Abb. 8 Lineweaver-Burk Diagramm für die Aufnahme von Strophanthin und ihre Hemmung durch verschiedene Digitoxin-Konzentrationen

Leberzellen(1,9 mg Protein/ml Inkubat)wurden inkubiert, wie in Abb. 2 beschrieben. Die Anfangsgeschwindigkeiten wurden wie in Abb. 2 ermittelt. Die Digitoxin-Konzentrationen waren: Kontrolle 0 uM (△), 0,5 uM (□), 2,5 uM (○), 10 uM (●). Da bereits die niedrigste Digitoxin-Konzentration von 0,5 uM (□) maximal hemmt, wurde für alle Konzentrationen nur eine Kurve eingezeichnet.

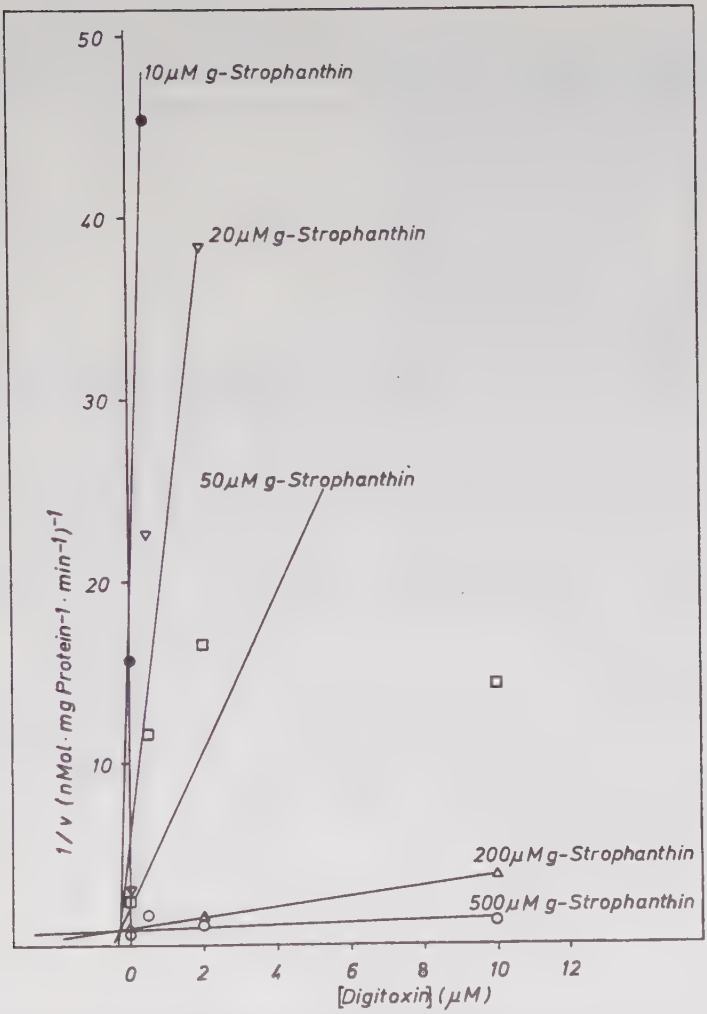


Abb. 9 Dixon-Diagramm der Strophanthin-Aufnahme für die Bestimmung des K_i von Digitoxin

Die reziproken Aufnahmegeschwindigkeiten bei verschiedenen Strophanthin-Konzentrationen aus der Abb. 8 wurden gegen die Digitoxin-Konzentrationen aufgetragen. Die Strophanthin-Konzentrationen waren: 10 uM (●), 20 uM (▽), 50 uM (□), 200 uM (△), 500 uM (○).

hohen Substratkonzentrationen. Der gemeinsame Schnittpunkt der Geraden über der Abszisse deutet ebenfalls darauf hin, daß die Hemmung kompetitiv ist. Die Projektion des Schnittpunktes auf die X-Achse ergibt einen K_i-Wert von 0,3 uM.

4. Hemmung durch 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB)

Über den Transport von Taurocholat (21) und anderen Steroiden (Cortisol) (24) ist bekannt, daß er durch SH-Reagenzien wie DNFB gehemmt wird. Falls diese Hemmung an einem funktionellen Ort des Steroidtransportmoleküls angreift, sollte auch die Aufnahme von Strophanthin durch DNFB beeinflusst werden. Abb. 10 zeigt, daß DNFB tatsächlich die Aufnahme in einer konzentrationsabhängigen Weise erniedrigen kann. Es ist auffällig, daß die Anfangsgeschwindigkeit während der ersten 1,5 min weniger erniedrigt wird als die intrazelluläre Konzentration nach 21 min. Dies könnte darauf hinweisen, daß DNFB gar nicht am Transportprotein selbst, sondern vielmehr in die noch zu beschreibende Energieübertragung eingreift. Für die Erniedrigung der Aufnahme um 50% wurde ein I_{50}-Wert von 11 uM DNFB ermittelt. Die Hemmung durch DNFB ist zwischen 1 mM und 10 mM Strophanthin unabhängig von der Strophanthinkonzentration.

5. Einfluß von Na^+, K^+, Mg^{++}, Ca^{++}

Der Membrantransport vieler Substrate ist abhängig vom Na^+-Gradienten, der möglicherweise die Energie für die intrazelluläre Akkumulation liefert (21, 32, 34). Da Strophanthin intrazellulär akkumuliert wird, könnte auch bei diesem Transport eine Kopplung der Aufnahme an die extrazelluläre Na^+-Konzentration bestehen. Zur Lösung dieser Frage wurden ver-

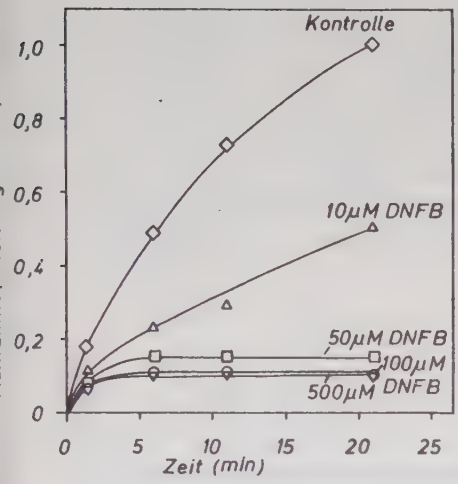


Abb. 10

Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von 10 uM Strophanthin und ihre Hemmung durch 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB)

Leberzellen(1,2 mg Protein/ml Inkubat)aus der Vorratsuspension wurden, wie in Abb. 2 beschrieben, inkubiert. Das DNFB wurde 10 sec vor Strophanthin zur Inkubationsuspension gegeben. In der Suspension entstanden folgende DNFB-Konzentrationen: Kontrolle 0 uM (◇), 10 uM (△), 50 uM (□), 100 uM (○), 500 uM (▽).

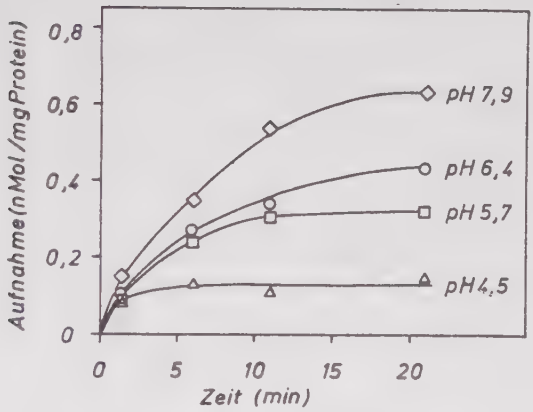


Abb. 11 Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von Strophanthin in Abhängigkeit verschiedener pH-Werte

Leberzellen(1,5 mg Protein/ml Inkubat)wurden aus der Vorratsuspension entnommen und inkubiert, wie in Abb. 2 beschrieben, Dabei wurde der pH-Wert 20-30 sec vor der Zugabe von Strophanthin im Inkubationsgefäß eingestellt und nach der Strophanthinzugabe wieder kontrolliert. Die Strophanthin-Konzentration betrug 10 uM. Es wurden Kurven bei folgenden pH-Werten registriert: pH 4,5 (△), pH 5,7 (□), pH 6,4 (○), pH 7,9 (◇).

schiedene Inkubationsmedien hergestellt, bei denen das Na^+ durch K^+ in folgenden Mischverhältnissen ersetzt worden war: 0% K^+, 20% K^+, 40% K^+, 60% K^+, 80% K^+ und 100% K^+. Ein Einfluß von Na^+ konnte weder bei sehr niedrigen (7 nM) noch bei sehr hohen (4 mM) Strophanthinkonzentrationen festgestellt werden. Bei allen Mischverhältnissen blieb sowohl die Anfangsgeschwindigkeit als auch die intrazelluläre Akkumulation von Strophanthin unverändert.

6. Einfluß des pH:

In Vorversuchen wurde ermittelt, in welchem Bereich sich der pH bei Zugabe von NaOH und HCl bewegt. Im eigentlichen Versuch wurden die Zellen unter Standardbedingungen (pH 7,2) 9,5 min vorinkubiert. Ungefähr 30 Sekunden vor der Zugabe von Strophanthin wurde zur Ermittlung des gewünschten pH-Wertes eine Menge zwischen 2 ul und 10 ul der entsprechenden Lösung von NaOH oder HCl der Zellsuspension zugegeben. Abb. 11 zeigt den Einfluß des pH auf die Aufnahme von Strophanthin (100 uM). Das pH hat einen geringeren Einfluß auf die Anfangsgeschwindigkeit, aber einen größeren auf die intrazelluläre Akkumulation. In Abb. 12 sind die Anfangsgeschwindigkeiten bei 3 verschiedenen Strophanthinkonzentrationen in Abhängigkeit vom pH dargestellt. Zwischen pH 3,5 und pH 8,8 nehmen die Anfangsgeschwindigkeiten (7 nM - 20 uM Strophanthin) stetig zu; ein pH-Optimum wurde in dem gemessenen Bereich nicht festgestellt.

7. Einfluß der Temperatur

Um Informationen über die Aktivierungsenergie des Aufnahmeprozesses zu erhalten, wurden Inkubationen bei verschiedenen

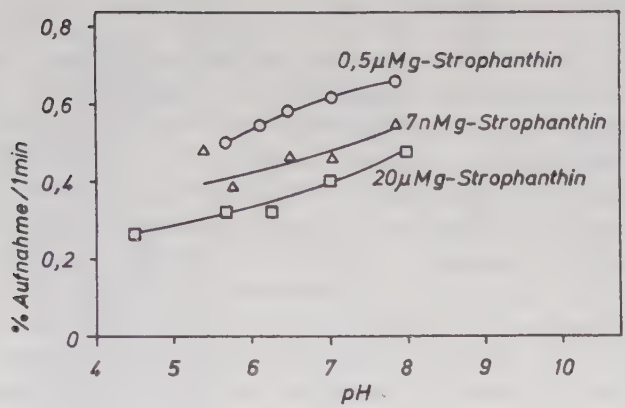


Abb. 12 Anfangsgeschwindigkeit der Aufnahme in Abhängigkeit des pH

Die Werte für die Anfangsgeschwindigkeiten der Aufnahme von Strophanthin wurden bei verschiedenen pH-Werten gemessen unter gleichen Bedingungen wie in Abb. 11 beschrieben. Folgende Strophanthin-Konzentrationen wurden verwendet: 7 nM (△), 0,5 uM (○), 20 uM (□). Die Aufnahmegeschwindigkeit wurde ausgedrückt als Prozent der verabreichten Dosis pro einer Minute.

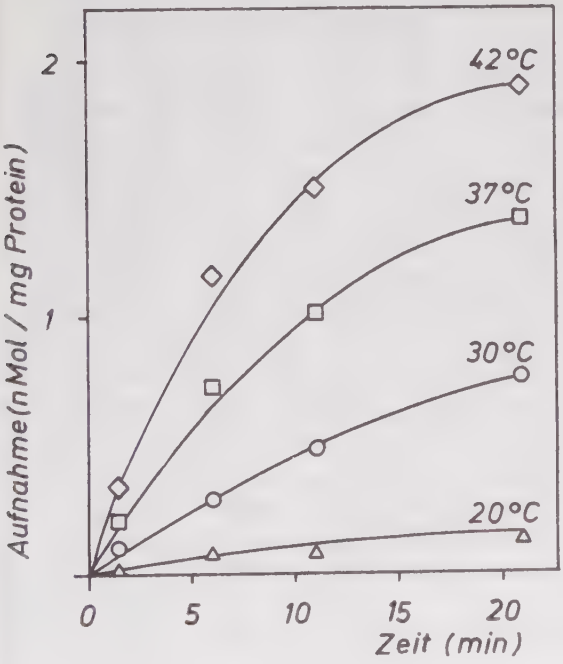


Abb. 13

Temperaturabhängigkeit der Strophanthin-Aufnahme

Leberzellen(1,7 mg Protei/ml Inkubat) wurden inkubiert, wie in Abb. 2 beschrieben, zusätzlich bei verschiedenen Temperaturen. Die verwendete Strophanthin-Konzentration betrug: 20 uM. Dabei bedeutet: 20°C (△), 30°C (○), 37°C (□), 42°C (◇).

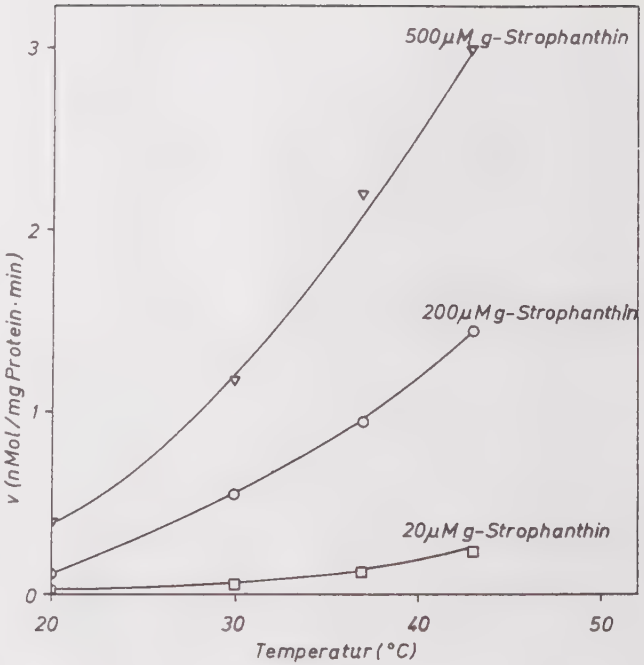


Abb. 14 Anfangsgeschwindigkeit der Strophanthin-Aufnahme bei verschiedemen Temperaturen

Die Anfangsgeschwindigkeiten der Strophanthin-Aufnahme wurden aus den Aufnahmekurven von Abb. 13 und zusätzlichen Werten bei anderen Strophanthin-Konzentrationen über 21 min ermittelt. Dabei wurden die Strophanthin-Konzentrationen und die Temperatur variiert. Folgende Strophanthin-Konzentrationen wurden angewendet: 20 uM (□), 200 uM (○), 500 uM (▽).

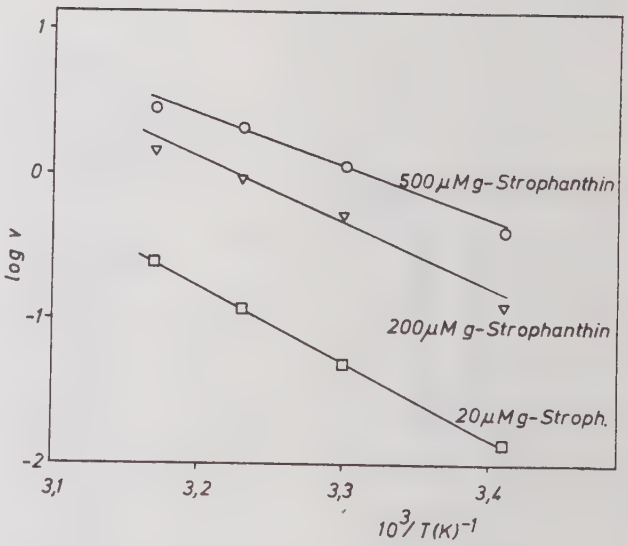


Abb. 15 Arrhenius-Diagramm der Strophanthin-aufnahme

Der Logarithmus der Anfangsgeschwindigkeiten (v in nMol/mg Zellprotein x min)aus Abb. 14 wurde berechnet und gegen 1/T aufgetragen. Es bedeutet: 20 uM (□) mit einer Aktivierungsenergie ΔE = 23,48 Kcal/Mol, 200 uM (▽) mit ΔE = 23,63 Kcal/Mol, 500 uM (○) mit ΔE = 18,95 Kcal/Mol.

Temperaturen durchgeführt. Abb. 13 zeigt den zeitlichen Verlauf der Aufnahme von Strophanthin bei 4 verschiedenen Temperaturen: bei Erniedrigung der Temperatur nimmt die Aufnahmegeschwindigkeit ab. In Abb. 14 sind die Anfangsgeschwindigkeiten der Aufnahme als Funktion der Temperatur bei 3 verschiedenen Strophanthinkonzentrationen aufgetragen. Zur Ermittlung der Aktivierungsenergien wurden die Anfangsgeschwindigkeiten aus Abb. 13 auf halblogarithmisches Papier gegen die reziproke absolute Temperatur nach Arrhenius (35) aufgetragen (Abb. 15). Die Steigungen der resultierenden Geraden sind ein Maß für die Aktivierungsenergie der Aufnahme; folgende Aktivierungsenergien (ΔE) wurden ermittelt: für 20 uM und 200 uM Strophanthin ΔE = 23 Kcal/Mol, für 500 uM Strophanthin ΔE = 19 Kcal/Mol.

8. Einfluß von Antimycin A

Um weitere Informationen über die Energieabhängigkeit der Aufnahmereaktionen zu erhalten, wurde Antimycin A, ein Atmungshemmer, 10 sec vor der Zugabe von Strophanthin zur Zellsuspension pipettiert. Abb. 16 zeigt, daß die Aufnahme von 10 uM Strophanthin in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Antimycin A (20 uM - 500 uM) gehemmt wird. Also ist das mitochondriale ATP die wichtigste Energiequelle für die Akkumulation von Strophanthin. Die Hemmung ist zwar konzentrationsabhängig, aber auch bei hohen AA-Konzentrationen ist sie nicht vollständig und weist einen Sockelbetrag auf. Um die Hemmung durch Antimycin A quantifizieren zu können, wurde die Restgeschwindigkeit bei der höchsten AA-Konzentration von den übrigen Anfangsgeschwindigkeiten der Aufnahme abgezogen. In Abb. 17 sind die so berechneten Anfangsgeschwindigkeiten reziprok gegen die Antimycin A-Konzentrationen nach Dixon aufgetragen. Der Schnittpunkt der Geraden mit der X-Achse ergibt einen

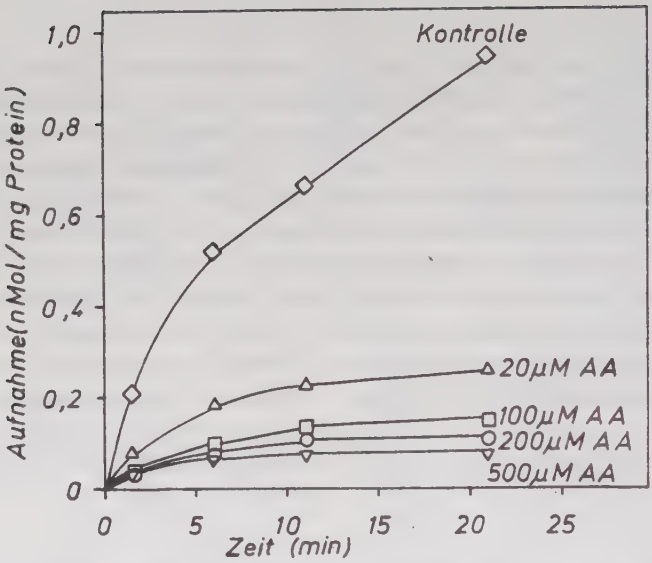


Abb. 16 Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von 10 uM Strophanthin und ihre Hemmung durch Antimycin A (AA)

Leberzellen(1,2 mg Protein/ml Inkubat)wurden inkubiert, wie in Abb. 2 beschrieben. Der metabolische Hemmer AA wurde 10 sec vor der Strophanthingabe dem Inkubationsansatz hinzugefügt. Folgende AA-Konzentrationen wurden verwendet: Kontrolle 0 uM (◇), 20 uM (△), 100 uM (□), 200 uM (○), 500 uM (▽).

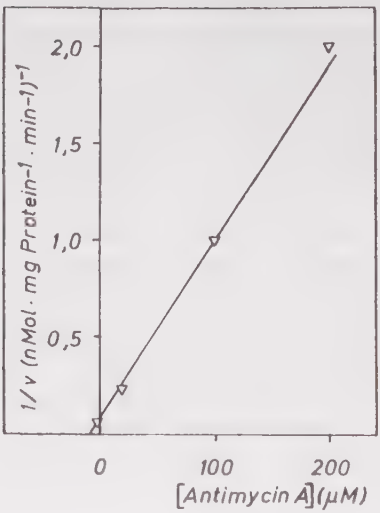


Abb. 17 Dixon-Diagramm der Strophanthin-Aufnahme zur Ermittlung des K_i von AA

Die nicht hemmbare Restgeschwindigkeit bei der höchsten AA-Konzentration wurde von den übrigen Anfangsgeschwindigkeiten der Aufnahme in Abb. 16 abgezogen. Die daraus resultierenden Anfangsgeschwindigkeiten wurden reziprok gegen die AA-Konzentration aufgetragen.

I_{50}-Wert von 6 uM AA. Dieser Wert erscheint sehr hoch in Anbetracht der niedrigen Konzentrationen, die die mitochondriale Atmung effektiv hemmen (0,2 uM - 2 uM). Jedoch dürfte die wirksame Konzentration durch Bindung an zelluläre Membranen in dem vorliegenden Versuch wesentlich niedriger als 6 uM sein.

9. Einfluß der Vorinkubation

Da die Vorratsuspension bei $0^{o}C$ aufbewahrt wurde, können die Zellen durch ihre geringe Stoffwechselaktivität nicht die elektrochemischen Ionengleichgewichte aufrechterhalten wie bei der physiologischen Temperatur von $37^{o}C$. So wurde z.B. gezeigt, daß sich erst im Verlauf einer 15-minütigen Vorinkubation bei $37^{o}C$ die physiologischen Na^{+}, K^{+}-Gleichgewichte intra- und extrazellulär annähernd normalisiert haben (36). Bei den vorliegenden Experimenten wurde die Vorinkubation von 0 bis 30 min variiert; dabei wurde weder die Anfangsgeschwindigkeit noch die intrazelluläre Konzentration von Strophanthin beeinflußt. Dies steht im Gegensatz zu einer 4 - 5-fachen Erhöhung der Anfangsgeschwindigkeit von Taurocholat während einer Vorinkubation von 30 min.

10. Austauschdiffusion

Unter Austauschdiffusion versteht man das Phänomen, daß ein intrazelluläres Substrat, das mit dem Extrazellulärraum im Gleichgewicht steht, nach Zugabe eines Substratüberschusses zum Extrazellulärraum teilweise wieder aus der Zelle strömt. Diese Austauschdiffusion gibt es nur bei sättigbaren Trans-

portsystemen (cf. 37). In den vorliegenden Experimenten wurde geprüft, ob für Strophanthin eine Austauschdiffusion vorliegt, indem Zellen zunächst mit einer Spurenmenge an radioaktivem Strophanthin 38 min lang beladen wurden und dann in den gleichen Inkubationsansatz eine größere Menge nicht radioaktiven Strophanthins zugegeben wurde. Die Abb. 18 zeigt den zeitlichen Verlauf der intrazellulären Radioaktivität während des Experiments. Zugabe des nicht radioaktiven Strophanthins führt zu einem Ausstrom des markierten Strophanthins mit einer Geschwindigkeit von 2,6%/min. Insgesamt nimmt die Aktivität um 30% ab. Die Anfangsgeschwindigkeit der Abnahme entspricht etwa der Hälfte der anfänglichen Aufnahmegeschwindigkeit und ist damit, wie später gezeigt wird, mehr als doppelt so schnell wie die Abgabe in Abwesenheit von extrazellulärem Strophanthin. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, daß es einen Transmembraneffekt gibt, d.h., daß ein beladener Carrier, der außen besetzt wurde, schneller auf die Innenseite der Membran gelangen kann, als ein unbeladener und nun für den Austransport des intrazellulären Strophanthins bereitsteht. Der Transmembraneffekt wird im folgenden Abschnitt beschrieben. Vorher soll noch darauf hingewiesen werden, daß sowohl kompetitive Hemmer der Aufnahme wie Taurocholat als auch metabolische Hemmer wie Antimycin A ebenfalls zu einem Ausstrom des äquilibrierten Strophanthins führen (vgl. Abb. 18). Eine Verdrängung von Strophanthin aus intrazellulären Bindungen dürfte kaum zu diesem Effekt beitragen, da Strophanthin, wie später gezeigt wird, nur zu einem kleinen Anteil in der Zelle gebunden ist.

11. Transmembraneffekt

Die Frage, ob der Carrier, der für die Aufnahme von Strophanthin zuständig ist, auch die Abgabe aus vorher beladenen Zel-

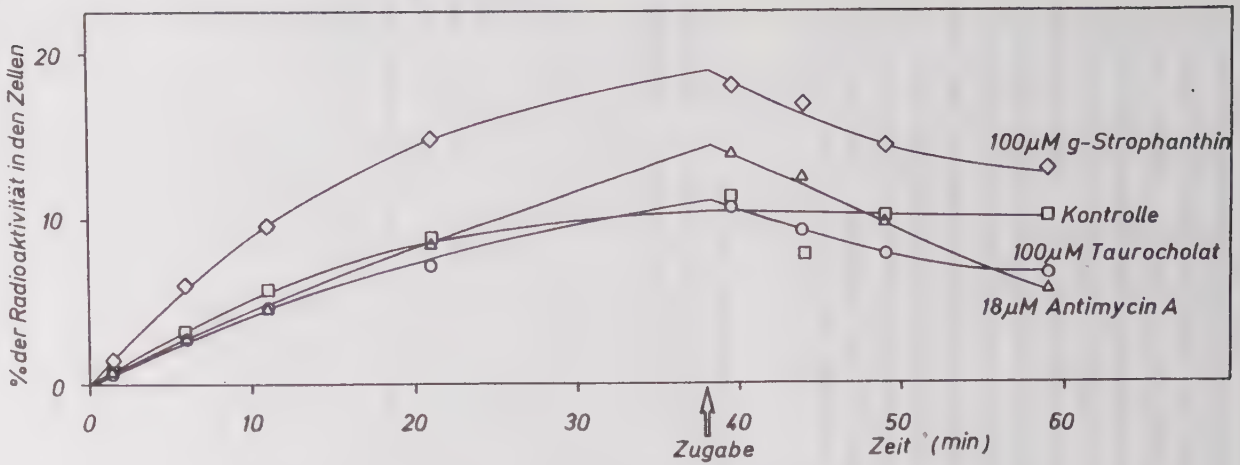


Abb. 18: Zeitlicher Verlauf der Strophanthin-Aufnahme während 38 min und anschließender Abgabe

Leberzellen (1,3 mg Zellprotein/ml Inkubat) wurden aus der Vorratssuspension entnommen und in 2 ml Medium bei pH 7,3 und 37°C unter Rühren 5 min vorinkubiert. Beim Zeitpunkt 0 wurden die Zellen mit einer niedrigen Konzentration markierten Strophanthins beladen (7 nM). Nach 1,5 6 11 und 21 min wurden Proben gezogen und abzentrifugiert.Folgende Substanzen wurden am Zeitpunkt t_{38} hinzugefügt: Kontrolle (□), 100 uM Strophanthin (◇), 100 uM Taurocholat (○), 18 uM Antimycin A (△). Nach 40,5 44 49 und 59 min wurden wieder Proben von 200 ul entnommen und zentrifugiert. Aufgetragen wurde der aufgenommene Anteil der Radioaktivität der Zellen gegen die Zeit.

len vermitteln kann, soll in folgender experimenteller Anordnung untersucht werden (cf 37). Zwei parallele Inkubationen wurden angesetzt. In der einen wurde unmarkiertes Strophanthin (100 uM) zur Aufnahme angeboten, während der zweiten Fraktion kein Strophanthin zugegeben wurde. Nach 20 minütiger Inkubation wurden die Zellen bei der Inkubation durch Zentrifugation vom Medium befreit; danach enthielt die eine Zellcharge kein Strophanthin, der intrazelluläre Strophanthingehalt der anderen Charge wurde zu 7,4 mM berechnet. Nun wurden beide Chargen erneut inkubiert, diesmal in Anwesenheit von sehr geringen Mengen (7 nM) radioaktiven Strophanthins. Die Aufnahme der Radioaktivität in die Zellen wurde während der folgenden 21 min gemessen. Die Ergebnisse aus vier identischen Versuchen sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1 Darstellung des Transmembraneffektes

Zellen(1,3 mg Zellprotein/ml Inkubat)wurden in zwei getrennten Inkubationsansätzen bei 37°C, pH 7,3 und unter Rühren 5 min vorinkubiert. Beim Zeitpunkt 0 wurde dem einen Ansatz 100 uM nicht radioaktives Strophanthin zur Aufnahme angeboten, dem anderen aber kein Strophanthin. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert. Die eine Charge enthielt kein Strophanthin, die andere Charge wurde zu 7,4 mM intrazellulärer Strophanthin-Konzentration berechnet. Anschliessend wurden beide Chargen erneut getrennt,nach Zugabe von 7 pMol radioaktivem Strophanthin in 1 ml Medium 21 min inkubiert: durch die etwa 70-fache Verdünnung des extrazellulären Mediums wurde die extrazelluläre Strophanthinkonzentration in der beladenen Charge etwa 1 mM, bei den unbeladenen Zellen bestand sie nur aus 7 nM ^{3}H-Strophanthin. Die Aufnahme des markierten Strophanthins wurde gemessen. Die Aufnahmegeschwindigkeiten für das markierte Strophanthin sind in der Tabelle als % Aufnahme/1 min angegeben.

Art der Zell-	Strophanthin-Konzentr.(uM)		Aufnahmegeschw.
vorbehandlung	intrazellulär	extrazellulär	v (% / min)
beladen	7,4 mM	1,005 uM	0,47±0,11
unbeladen	0 mM	0,005 uM	0,11±0,05

n = 4

Es zeigt sich, daß die Aufnahmegeschwindigkeit für das radioaktive Strophanthin in die vorbeladenen Zellen mehr als das 4-fache der Geschwindigkeit im Vergleich zu den unbeladenen Zellen beträgt. Diese Ergebnisse könnten durch einen Transmembraneffekt erklärt werden, das heißt, durch das Phänomen, daß ein mit Strophanthin beladener Carrier schneller die Membran durchqueren kann, als ein unbeladener, und daß der Carrier in beide Richtungen Strophanthin transportieren kann. Durch das große Angebot an intrazellulärem Strophanthin würde dann der Carrier öfters von innen nach außen bewegt und könnte außen für die Bindung des radioaktiv-markierten Strophanthins häufiger zur Verfügung stehen.

12. Mechanische Zellschädigung

Strophanthin wird beim Menschen mit hoher Affinität an Rezeptoren der Erythrozytenmembran gebunden; diese Rezeptoren sind identisch mit der $(Na^+ + K^+)$-ATPase (38). Ein Transport in das Erythrozyteninnere ist nicht nachweisbar. In ähnlicher Weise könnte Strophanthin auch an die Oberfläche der Leberzellmembran in einen langsamen Prozess gebunden werden. Um einen qualitativen Hinweis dafür zu erhalten, daß Strophanthin tatsächlich in die Zelle aufgenommen wird, wurden Zellen nach der Inkubation durch 10-maliges Aufziehen in der Pipette mechanisch geschädigt und dann erst zentrifugiert. Das zelluläre Material ließ sich zwar vollständig sedimentieren, die Radioaktivität im zellulären Sediment aber war, wie Abb. 19 zeigt, erniedrigt. Dies deutet darauf hin, daß der größte Anteil an Strophanthin nicht an die Zellmembran gebunden wird.

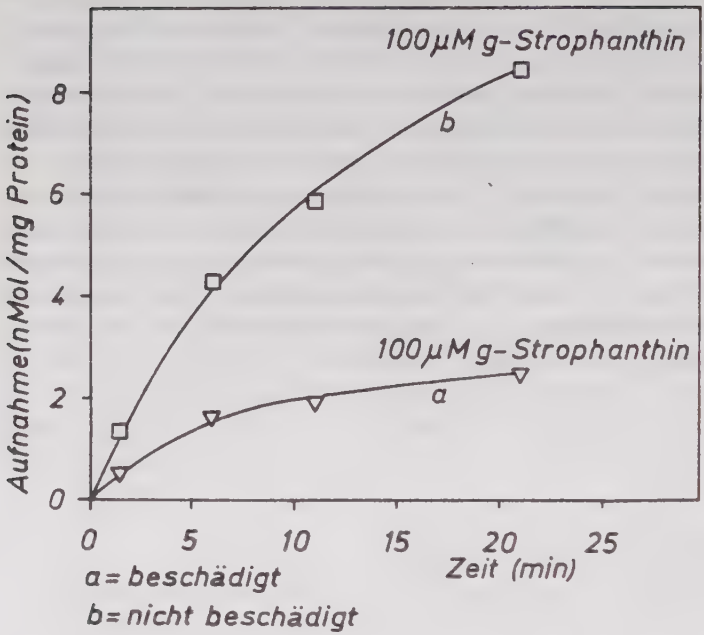


Abb. 19 Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von Strophanthin über 21 min nach Beschädigen der Zellen

Leberzellen(1,2 mg Protein/ml Inkubat)wurden inkubiert, wie in Abb. 2 beschrieben. Nach Zugabe 10 ul 10 mM Strophanthin befand sich in der Inkubationsuspension eine Endkonzentration von 100 uM Strophanthin. Bei 1,5 6 11 und 21 min wurden Proben gezogen; in einem Eppendorfgefäß wurde der Pipetteninhalt 10 mal auf-und niederpipettiert und so die Zellen beschädigt. Es bedeutet: a = beschädigte Zellen (▽), b = nicht beschädigte Zellen (□) - Kontrolle.

13. Einfluss von Äthanol

MADDREY und BOYER (1973) fanden, daß die akute Gabe von Äthanol den Gallefluß in der Ratte hemmt (39). Auch ist bekannt, daß Äthanol die Plasmaretention verschiedener Pharmaka, die durch die Leber ausgeschieden werden, erhöht (40). Dies führt zu der Frage, ob Äthanol den Membrantransport der gallegängigen Substanzen direkt hemmen kann. Gerade bei den Herzglykosiden mit langer Halbwertszeit und geringer therapeutischer Breite könnte eine solche Interaktion zu einer Akkumulation mit Intoxikation führen. Deshalb wurde die zeitliche Aufnahme von 10 uM Strophanthin unter Zugabe steigender Konzentrationen von Äthanol(0-30%) gemessen. Abb. 20 zeigt, daß Äthanol konzentrationsabhängig die Aufnahmegeschwindigkeit vermindert. Werden die Anfangsgeschwindigkeiten von Abb. 20 im Dixon-Diagramm aufgetragen (Abb. 21), so ergibt sich eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der X-Achse einen I_{50}-Wert von 11% Äthanol ergibt. Bei 1% Äthanol beträgt die Hemmung 9%.

II. ABGABE VON STROPHANTHIN AUS ISOLIERTEN LEBERZELLEN

1. Zeitlicher Verlauf

Bei der Ratte wird Strophanthin unverändert in die Galle ausgeschieden. Wegen der starken Konzentrierung von Strophanthin in der Galle wurde angenommen, daß die Sekretion aus der Leberzelle in die Canaliculi aktiv erfolgen könnte, jedoch fehlen experimentelle Indizien für einen solchen Mechanismus. Isolierte Rattenleberzellen haben sich für die Untersuchung der zellulären Sekretion von Taurocholat als sehr nützlich erwiesen (21). Deshalb lag es nahe zur Untersuchung der Sekretion von Strophanthin, ähnliche Abgabeexperimente durchzuführen. Zellen wurden in einer 30-minütigen Inkubations-

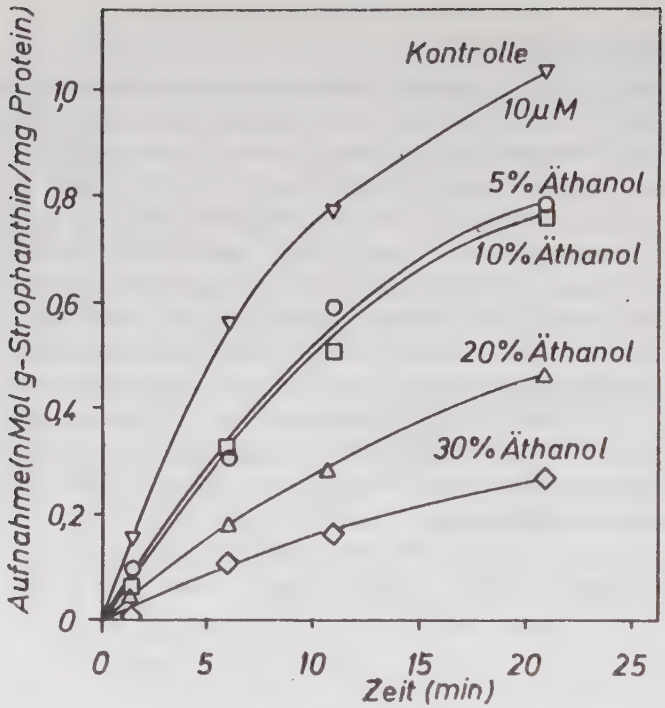


Abb. 20 Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von Strophanthin unter Einfluß von Äthanol

Leberzellen(1,3 mg Protein/ml Inkubat) wurden inkubiert, wie in Abb. 2 beschrieben, Die verschiedenen Alkohol- Konzentrationen wurden zum Zeitpunkt 0 zusammen mit Strophanthin dem Inkubat hinzugefügt. Die Strophanthin-Konzentration war 10 uM, die Äthanolkonzentrationen waren: 0% (▽), 5% (○), 10% (□), 20% (△), 30% (◇).

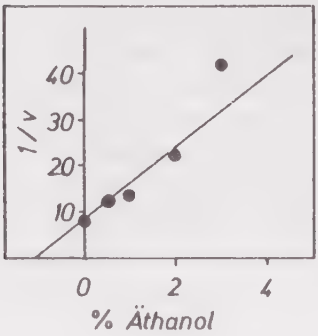


Abb. 21 Dixon-Diagramm der Strophanthin-Aufnahme zur Bestimmung des K_i

Die Anfangsgeschwindigkeiten der Aufnahme wurden der Abb. 20 entnommen und reziprok gegen die Äthanol-Konzentration aufgetragen. v in nMol/mg Protein x min. Die Strophanthin-Konzentration war 10 uM (●).

phase mit radioaktivem Strophanthin beladen. Aus dieser Suspension wurden 100 ul in 2 ml eines Mediums, das kein Strophanthin enthielt, überführt. In dieser Versuchsanordnung geben die Zellen das aufgenommene Strophanthin langsam ins strophanthinfreie Medium wieder ab. In Abb. 22 ist der zeitliche Verlauf des Ausstromes von Strophanthin nach Beladen mit 4 verschiedenen Konzentrationen dargestellt. Es kann entnommen werden, daß in einer Minute ungefähr 1% des Strophanthins (bei 1,2 mg Protein/ml Inkubat) abgegeben wurde, unabhängig von der intrazellulären Konzentration an Strophanthin; es gibt also keine Tendenz zur Sättigung der Abgabegeschwindigkeit. Im Vergleich zur Aufnahmegeschwindigkeit ist die Abgabegeschwindigkeit 4-5 mal langsamer.

2. Einfluß von 2,4-Dinitrofluorbenzol und Antimycin A

Es wurde von SCHWARZ et al. gezeigt, daß sich die Abgabe von Taurocholat aus isolierten Leberzellen sowohl von SH-Reagenzien (DNFB) als auch durch metabolische Hemmer (AA) hemmen läßt. Dies wurde so gedeutet, daß die Sekretion von Taurocholat aus isolierten Leberzellen in ähnlicher Weise erfolgt wie die biliäre Sekretion in vivo. In den vorliegenden Untersuchungen wurde die Abgabe von Strophanthin weder durch DNFB noch durch AA beeinflußt (Abb. 23). Auf Grund dieser Ergebnisse kann die Vermutung, daß die biliäre Sekretion aktiv erfolgt, nicht bestätigt werden. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 2 dargestellt.

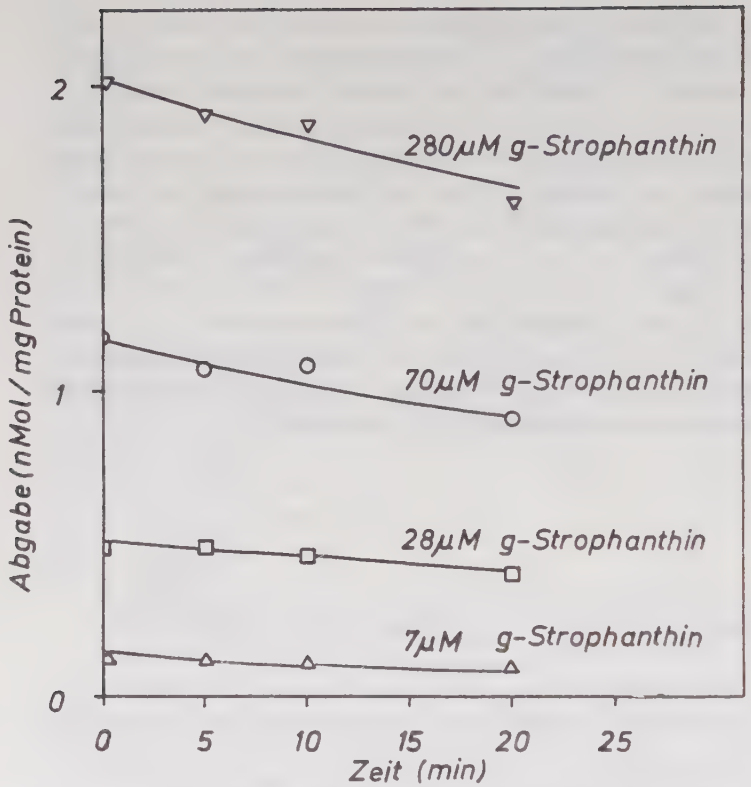


Abb. 22 Zeitlicher Verlauf der Abgabe von Strophanthin aus isolierten Leberzellen

Leberzellen(1,2 mg Zellprotein/ml Inkubat) wurden in 500 ul Medium unter Rühren bei 37°C 10 min vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe verschiedener Strophanthin-Konzentrationen: 7 uM (△), 28 uM (□), 70 uM (○), 280 uM (▽). Nach einer 30-minütigen Beladungsphase wurden 100 ul der Zellsuspension in 2 ml strophanthinfreies Medium überführt und die Abgabe über 20 min verfolgt. Die Mengenangabe an der rechten Seite der Kurven bezieht sich auf die extrazelluläre Strophanthin-Konzentration während der Beladung.

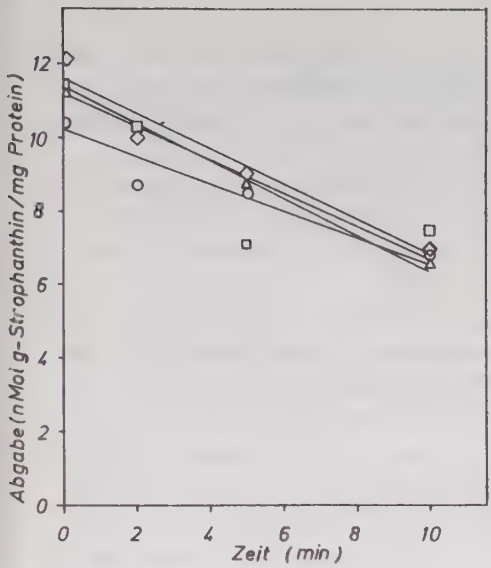


Abb. 23 Zeitlicher Verlauf der Abgabe von Strophanthin aus isolierten Leberzellen unter dem Einfluß verschiedener Substanzen

Leberzellen(0,4 mg Protein/ml Inkubat)wurden wie in Abb. 22 beschrieben, zunächst mit Strophanthin beladen und zur Messung der Abgabe erneut inkubiert. Die Inhibitoren AA und DNFB wurden in das Abgabemedium 10 sec vor Überführen der Zellen aus der Suspension zugegeben. Bei einer Abgabe war Na^+ durch K^+ ersetzt worden. Strophanthin war beim Beladen 10 uM. Es wurden folgende Konzentrationen verwendet: Kontrolle (Δ), 20 uM AA (◇), 100 uM DNFB (○), K^+-Medium (□).

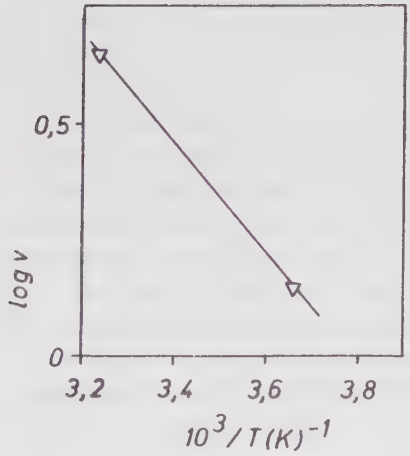


Abb. 24 Arrhenius-Diagramm der Strophanthinabgabe

Leberzellen(0,4 mg Protein/ml Inkubat)wurden inkubiert, wie in Abb. 22 beschrieben. Die Zellen wurden mit 10 mM Strophanthin (▽) beladen. Die Abgabe erfolgte in 22°C und 0°C. v ist in nMol/mg Protein x min angegeben. Die Anfangsgeschwindigkeiten bei 0°C und 22°C wurden Abgabekurven entnommen, die hier nicht dargestellt sind. Für die Abgabe ergab sich eine Aktivierungsenergie von ΔE = 5,40 Kcal/Mol.

Tabelle 2 Beeinflussung der Strophanthinabgabe durch Antimycin A und 2,4-Dinitrofluorbenzol

Leberzellen(0,4 mg Zellprotein/ ml Inkubat)wurden im Medium bei 37°C unter Rühren, wie bereits in Abb. 23 beschrieben, mit verschiedenen Strophanthin-Konzentrationen beladen und anschließend wurden 100 ul der Zellsuspension in 2 ml strophanthinfreies Medium übertragen. Die genannten Reagenzien wurden dem Abgabemedium beigefügt: 100 mM DNFB, 20 uM AA. v ist die Anfangsgeschwindigkeit der Abgabe in Prozent der anfänglichen zellulären Strophanthinmenge.

Inkubationsbedingungen	v (%/min)
Kontrolle	4,5
+ DNFB	5,0
+ AA	4,2

3. Einfluß der Temperatur

Die Geschwindigkeit der Abgabe von Strophanthin aus beladenen Zellen weist eine relativ geringe Temperaturabhängigkeit auf. Abb. 24 zeigt die Auftragung der Anfangsgeschwindigkeiten im Arrhenius-Diagramm. Aus der Steigung der Geraden läßt sich eine Aktivierungsenergie ΔE = 5,4 Kcal/Mol ermitteln.

4. Metabolismus

Da schon eine gering Metabolisierung von Strophanthin die Transportkinetik verfälschen könnte, wurden nach 20 min Inkubation Proben für eine dünnschichtchromatographische Analyse der Radioaktivität entnommen. Das Zellmaterial wurde in Äthanol denaturiert und zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine mit Silika-Gel beschichtete Folie (Merck) aufgetragen und in einem Fließmittel (Chloroform : Äthanol : Wasser - 65 : 30 : 5) entwickelt. Die Radioaktivität bestand zu über

98% aus unverändertem Strophanthin. Dies stimmt mit Befunden von LAUTERBACH et al. (5) überein, die keine Metabolisierung von Strophanthin in der Rattenleber nachweisen konnten.

5. Intrazelluläre Bindung

5.1. Mitochondrien

Bei der intrazellulären Akkumulation von Strophanthin könnte neben einem aktiven Transport zusätzlich eine intrazelluläre Bindung des Moleküls an Makromoleküle eine Rolle spielen, ähnlich wie bei Bromsulfthalein die Bindung an Ligandin die Akkumulation begünstigt. Auf das Ausmaß einer solchen Bindung kann unter Verwendung ganzer Zellen kaum geschlossen werden. Deshalb wurden Cytoplasma (100 000 x g Überstand) und Mitochondrien getrennt untersucht. Die Leberzellmitochondrien wurden nach einer Standardmethode isoliert (28). Die Mitochondrien (2,5 mg Protein/ml) wurden bei 37°C unter Rühren in 150 mM KCl + 0,1% EDTA mit verschiedenen Konzentrationen (5 uM - 100 uM) radioaktivem Strophanthin inkubiert. Nach 0,2 2 5 und 10 min wurden Proben gezogen und die Mitochondrien durch Silikonzentrifugation vom Medium getrennt. Unabhängig von der Strophanthinkonzentration und der Inkubationszeit betrug die mitochondriale Aufnahme immer (1,08± 0,3)% Strophanthin. Dies entspricht etwa dem Volumenanteil, den mitgerissener Mediumanteil und frei permeabler Intermembranraum unter diesen Bedingungen einnahmen (52), so daß ein Transport in den Matrixraum sehr unwahrscheinlich ist.

5.2. Cytoplasma

Der 100 000 x g Überstand wurde in 150 mM KCl präpariert und durch Ultrafiltration auf die ursprüngliche Konzentration an Makromolekülen gebracht. Diesem Überstand wurden verschiedene Konzentrationen (0,01 uM - 200 uM) an radioaktivem Strophan-

thin zugegeben; anschließend wurden durch Ultrafiltration 5% der Lösung abgepresst (Amicon-Ultrafiltrationsgerät) und die Radioaktivität im Eluat bestimmt. Die Radioaktivität im Eluat betrug 92% bis 88% der Radioaktivität im gleichen Volumen vor der Filtration, unabhängig von der Strophanthinkonzentration. Das bedeutet, daß nur zwischen 8-12% des Strophanthins an cytoplasmatisches Material gebunden sind. Diese Ergebnisse wurden durch Gleichgewichtsdialyse über eine Zellofanmembran in Teflonkammern bestätigt.

Die Bindung von Strophanthin an zelluläres Material beträgt demnach kaum mehr als 10% und kann daher zur Akkumulation des Moleküls nur einen unwesentlichen Beitrag leisten.

5.3. Zellmembran

Um schließlich ein Maß der Bindung an Rezeptoren der Plasmamembran zu erhalten, wurden Plasmamembranen isoliert (40). Die Membranen (0,4 mg Protein/ml) wurden bei 37°C mit Strophanthin in 1 ml 150 mM NaCl inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden 200 ul entnommen und die Membranen durch Zentrifugation in speziellen Zentrifugenröhrchen, die am Boden zapfenförmig ausgezogen sind, vom Medium abgetrennt (Beckmann Mikrofuge). Nach der Zentrifugation wurden die Spitzen der Röhrchen, die das Membranmaterial sichtbar enthielten, abgeschnitten und die Radioaktivität gemessen. Zur Ermittlung des Mediumvolumens im abgeschnittenen Röhrchenteil mußte sich in diesem Fall zusätzlich ^{14}C-Dextran im Inkubationsansatz befinden. Es stellte sich heraus, daß bei allen angewendeten Konzentrationen (10 nM - 200 uM) zwischen 2% bis 2,5% des Strophanthins an die Membran gebunden war; jede Tendenz einer absättigbaren Rezeptorbindung fehlt also.

6. Verteilungskoeffizient

Strophanthin besitzt unter den üblichen Herzglykosiden die höchste Wasserlöslichkeit; der Verteilungskoeffizient zwischen

Olivenöl/Wasser wurde zu 0,0044 ermittelt. Da das Molekül wegen der gleichmäßigen Umsäumung mit polaren Gruppen (vgl. Formelschema) weder lipophil noch amphiphil ist, erklärt sich die geringe Bindung an Zellmaterial.

III. AUFNAHME VON DIGITOXIN IN ISOLIERTE LEBERZELLEN

1. Olivenöl/Wasser-Verteilung von Digitoxin

Digitoxin (vgl. Formelschema) unterscheidet sich von Strophanthin durch eine geringere Anzahl an Hydroxyl-Gruppen am Steroidgerüst und durch eine größere Anzahl an Deoxy-Zuckern. Das Molekül ist dadurch sehr lipophil. Ein Olivenöl/Wasser-Verteilungskoeffizient von 42 wurde ermittelt.

2. Zeitlicher Verlauf der Aufnahme

Isolierte Leberzellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an ^{3}H-Digitoxin bei 37^{o}C inkubiert und die intrazellulären Anteile während der folgenden 21 min ermittelt. Wie Abb. 25 zeigt, ist die zelluläre Aufnahme von Digitoxin bereits bei der Entnahme des ersten Meßwertes nach 15 sec annähernd maximal. Die initialen intrazellulären Digitoxin-Konzentrationen, in der Abbildung durch den Schnittpunkt der Geraden mit der Y-Achse dargestellt, sind im Bereich zwischen 2 nM und 200 uM immer proportional zur extrazellulären Konzentration (nur zum Teil in Abb. 25 dargestellt). Im Verlauf der folgenden 21 min nimmt dann die intrazelluläre Konzentration an Digitoxin um etwa 10-20% ab. Um einen Vergleich zur viel langsameren Strophanthin-Aufnahme zu ermöglichen, wurde versucht, die Anfangsgeschwindigkeit durch Erniedrigung der Inkubationstemperatur zu verlangsamen.

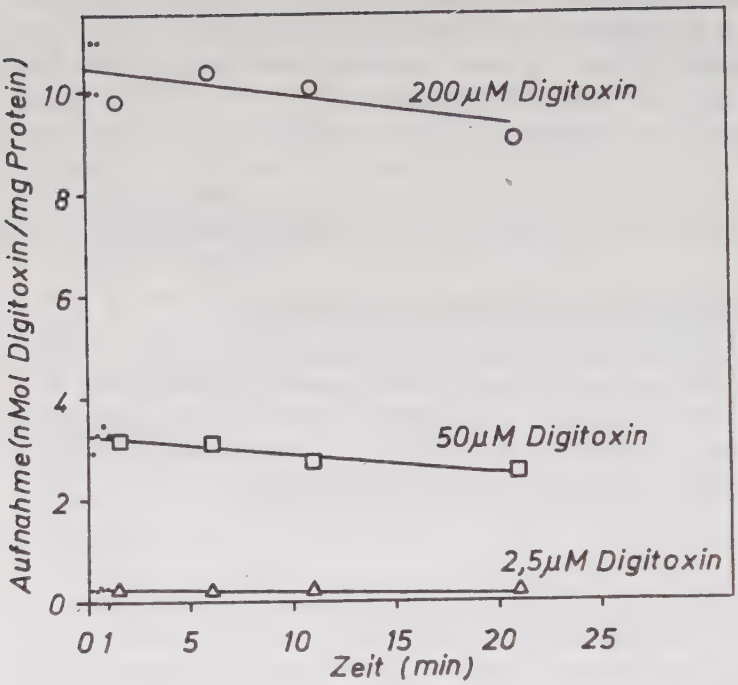


Abb. 25 Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von Digitoxin in isolierte Leberzellen

Leberzellen(2,7 mg Zellprotein/ml Inkubat) wurden im Medium unter Rühren bei 37°C und pH 7,3 10 min vorinkubiert. Es wurde weiter verfahren wie in Abb. 2 beschrieben. Außerdem wurden Proben nach 15 30 45 und 60 sec, in der Abb. durch Punkte dargestellt, nach 1,5 6 11 und 21 min abgenommen und zentrifügiert. Dabei wurden folgende Digitoxin-Konzentrationen verwendet: 2,5 uM (Δ), 50 uM (□), 200 uM (○).

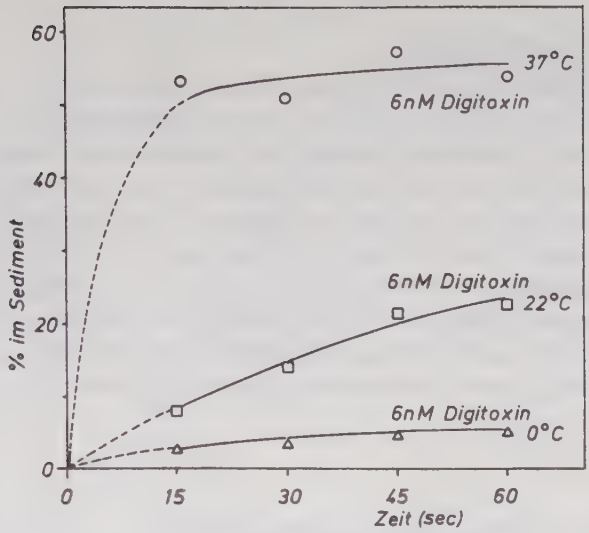


Abb. 26 Zeitlicher Aerlauf der Aufnahme von Digitoxin über eine Minute und bei verschiedenen Temperaturen

Leberzellen(1,3 mg Protein/ml Inkubat)wurden,wie in Abb. 2 beschrieben, inkubiert, zusätzlich bei verschiedenen Temperaturen. Es wurden Werte bei 15 30 45 und 60 sec gemessen und als Prozent der Gesamtradioaktivität, die im Sediment wiedergefunden wurde, gegen die Zeit aufgetragen. Dabei wurde eine Digitoxin-Konzentration von 6 nM verwendet. Die unterbrochene Linie (- - -) soll den möglichen Verlauf der Aufnahme während der ersten 15 sec, der nicht gemessen werden konnte, darstellen. Die Temperaturen waren: 37°C (O), 22°C (□), 0°C (Δ).

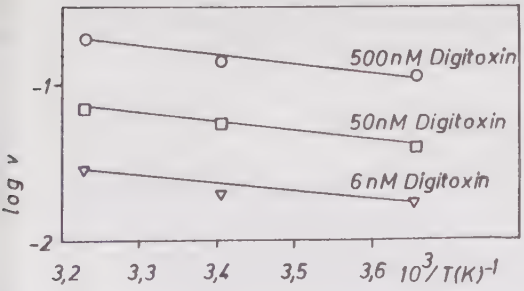


Abb. 27 Arrhenius-Diagramm der Digitoxin-Aufnahme

Die Anfangsgeschwindigkeiten der Aufnahme wurden verschiedenen Kurven entnommen, für 6 nM aus Abb. 26. Folgende Digitoxin-Konzentrationen wurden verwendet: 6 nM (▽), 50 nM (□), 500 nM (O). v ist in nMol/mg Protein x min angegeben. Aus der Darstellung ergibt sich eine Aktivierungsenergie von ΔE = 8,6 Kcal/Mol.

3. Einfluß der Temperatur

Die Abb. 26 zeigt die initiale Aufnahme von Digitoxin (6 nM). Mit fallenden Temperaturen wird die Anfangsgeschwindigkeit verlangsamt. Der prozentuale Anteil der zugegebenen Menge, der nach 15 sec von den Zellen aufgenommen wurde, wurde bei 3 verschiedenen Konzentrationen von Digitoxin durchgeführt. Die Aufnahme nach 15 sec wurde versuchsweise als Maß für die Anfangsgeschwindigkeit verwendet und im Arrhenius-Diagramm (Abb. 27) aufgetragen. Auf diese Weise wurde für die Aufnahme bei allen 3 angewendeten Digitoxin-Konzentrationen (6 nM - 500 nM) eine Aktivierungsenergie von ΔE = 8,6 Kcal/Mol berechnet.

4. Einfluß von DNFB, AA, K^+ und Strophanthin

Wie Abb. 26 gezeigt hat , ist die Anfangsgeschwindigkeit bei 22°C genügend langsam und kann quantitativ erfaßt werden. Unter diesen Versuchsbedingungen wurde die Aufnahme von Digitoxin, analog zu Strophanthin, unter dem Einfluß von DNFB, AA, K^+ und Strophanthin gemessen. In Abb. 28 sind repräsentative Werte aus Einzelexperimenten dargestellt. Weder durch die Zugabe von 100 uM DNFB noch 20 uM AA noch durch 100 uM Strophanthin konnte ein hemmender Effekt auf die Aufnahme erzeugt werden. Auch wenn das extrazelluläre Na^+ durch K^+ ersetzt wurde, blieb die Anfangsgeschwindigkeit der Digitoxin-Aufnahme unbeeinflußt (in der Abb. nicht dargestellt).

5. Wird Digitoxin metabolisiert?

In Abb. 25 war auffällig, daß die intrazelluläre Digitoxin-Konzentration im Verlauf der 21 minütigen Inkubation wieder abnahm. Es liegt die Vermutung nahe, daß die Abnahme durch Metabolisierung verursacht wird. Um dies festzustellen, wurde nach einer 21 minütigen Inkubation 200 ul aus der Zellsuspension entnommen und mit 400 ul Äthanol versetzt.

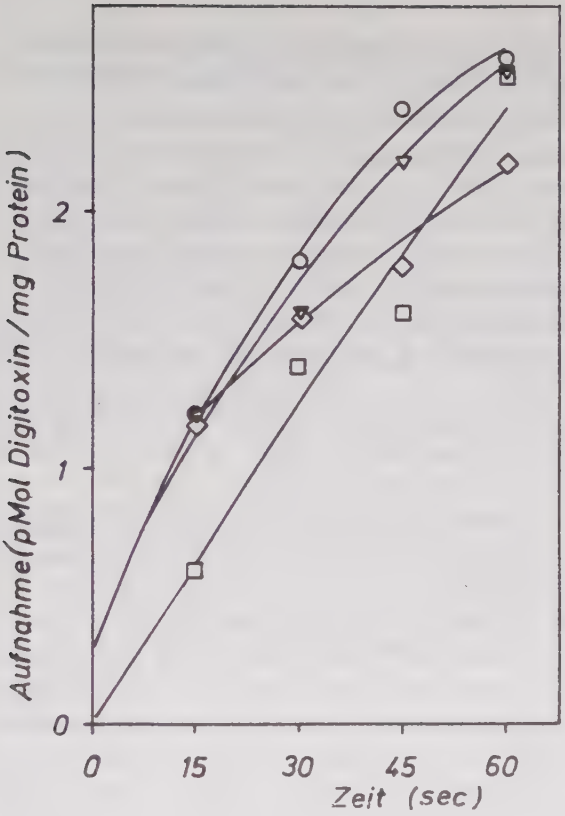


Abb. 28 Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von Digitoxin während einer Minute und unter dem Einfluß verschiedener Substanzen

Leberzellen(0,45 mg Protein/ml Inkubat)wurden inkubiert, wie in Abb. 2 beschrieben. Proben wurden nach 15 30 45 und 60 sec gezogen. Die Inhibitoren wurden einige Sekunden vor der Zugabe von Digitoxin zum Inkubat hinzugefügt. Um den Aufnahme-Vorgang zu verlangsamen, wurde eine Inkubationstemperatur von 22°C eingestellt. Es wurde eine 3 nM Digitoxin-Konzentration gewählt. Die Inhibitor-Konzentrationen waren: 100 uM DNFB (○), 100 uM Strophanthin (□), 20 uM AA (▽), Kontrolle (◇). Die Aufnahme ist in pMol gegen die Zeit aufgetragen.

Das denaturierte Protein wurde abzentrifugiert; dann wurden 50 ul des Überstandes auf eine Silika-Gel-Dünnschichtfolie aufgetragen und das Chromatogramm in einem Fließmittel, bestehend aus Chloroform : Äthanol - 9 : 1, entwickelt. Der R_F -Wert von Digitoxin lag bei 0,34. Etwa 74% der aufgenommenen Radioaktivität aus der Zellsuspension hatte die gleiche Laufstrecke wie Digitoxin; 12% schienen nach dem chromatographischen Verhalten mehr wasserlöslich und 14% mehr lipidlöslich. Die Ergebnisse der Aufnahme von Strophanthin und Digitoxin sind in Tabelle 3 vergleichend zusammengestellt.

Tabelle 3 Vergleich der Aufnahme von Strophanthin und Digitoxin in isolierte Leberzellen. Ein ml Inkubat-Ansatz enthielt etwa 1,5 mg Zellprotein, Messungen bei 37°C, pH 7,2.

	Strophanthin	Digitoxin
sättigbar	ja	nein
K_M	(239 ± 61) uM	-
v_{max}	(3,3 ± 1) nMol/mg Protein x min	-
hemmbar durch DNFB	ja	nein
" " AA	ja	nein
" " Strophanthin	-	-
hemmbar durch Digitoxin	ja, K_i=0,3 uM Digitoxin	-
hemmbar durch Äthanol	ja, I_{50}=11% Äthanol	nicht eindeutig
Aktivierungsenergie ΔE	23 Kcal/Mol	8,6 Kcal/Mol
Olivenöl/Wasser-Verteilung	0,0044	42
Na^+-abhängig	nein	nein

IV. EINFLUSS VON HERZGLYKOSIDEN AUF DIE ZELLVITALITÄT

Herzglykoside können als spezifische Hemmer der $(Na^+ + K^+)$-ATPase durch Einstrom von Na^+ Zellschädigungen verursachen. Außerdem ist denkbar, daß das lipophile Digitoxin zusätzlich unspezifische Veränderungen von Membraneigenschaften hervorrufen kann, ähnlich wie Digitoxin, das als Detergens Verwendung findet. Um mögliche Zellschädigungen festzustellen, wurden die sonst üblichen Vitalitätskriterien für isolierte Leberzellen nach 20 minütiger Inkubation mit 200 uM Strophanthin bzw. 100 uM Digitoxin getestet.

1. Einfluß auf die Zellatmung

Zunächst wurde die Zellgrundatmung während 1,5 min gemessen; anschließend wurde Succinat zugefügt, das im Falle einer erhöhten Permeation der Leberzellmembran zu einer Atmungssteigerung führt, schließlich wurde der Entkoppler CCP, als Maß der mitochondrialen Funktion, zugegeben. Zu Beginn und 4 Stunden später, am Ende des Experiments, wurde je eine Kontrollinkubation ohne Herzglykoside durchgeführt. Die Grundatmung hat bei der zweiten Messung abgenommen. Bei beiden Kontrollen ist kein Effekt durch Succinat vorhanden; der Atmungskontrollquotient beträgt 1,42. Auch nach 20 minütiger Inkubation, in Anwesenheit von Strophanthin und Digitoxin, nimmt der Atmungskontrollquotient nicht deutlich ab.

2. Einfluß auf die Anfärbbarkeit mit Trypanblau

Die Leberzellen wurden 5 min bzw. 20 min mit 0,2%-igem Trypanblau inkubiert, mit und ohne Herzglykoside. Je 150 Zellen wurden ausgezählt und der prozentuale Anteil an gefärbten Zellen in der Zählkammer ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt. Auch in Abwesenheit von Herzglykosiden

erhöht sich der Anteil an gefärbten Zellen im Verlauf der Inkubationszeit signifikant; dagegen kann keine deutliche Wirkung von Herzglykosiden auf die Anfärbbarkeit aus diesen Ergebnissen beobachtet werden.

Tabelle 4 Effekt von Strophanthin und Digitoxin auf die Anfärbbarkeit mit Trypanblau

Leberzellen wurden wie in Tabelle 3 beschrieben, inkubiert, jedoch in Anwesenheit von 0,2%igem Trypanblau. Dem Inkubationsansatz wurden 200 uM Strophanthin bzw. 100 uM Digitoxin zugeführt. Es wurden jeweils 150 Zellen (in der Neubauer-Kammer) ausgezählt und der prozentuale Anteil an gefärbten Zellen ermittelt.

Zellbehandlung	% Trypanblau (anfärbbar)	
	nach 5 min	nach 20 min
Kontrolle(frische Zellen)	5	21
200 uM Strophanthin	12	26
100 uM Digitoxin	10	17
Kontrolle (nach 3 Std.)	10	23

D. DISKUSSION

I. STROPHANTHIN: MEMBRANBINDUNG ODER MEMBRANTRANSPORT?

Es ist wohl bekannt, daß Strophanthin von der Leber aus der Blutbahn aufgenommen wird und nach Konzentrierung in erheblichem Maße bei der Ratte in die Galle abgegeben wird (5, 14, 15). Dabei muß Strophanthin die Leberzellmembran zweimal passieren. Die rasche Elimination eines wasserlöslichen Moleküls und die Akkumulation gegen ein elektrochemisches Gleichgewicht in der Galle geben schon bei den in vivo-Versuchen Hinweise darauf, daß spezifische Transportmechanismen die Permeation durch die Membran ermöglichen.

In den letzten Jahren hat sich zunehmend gezeigt, daß isolierte Leberzellen ein besonders geeignetes Modell für Transportstudien darstellen (42 - 47 / 54, 55). Für 10 verschiedene Steroide wie Cortisol, Corticosteron, Östron, Gallensäuren usw., wurden seither spezifische Transportmechanismen postuliert. In einer neuen Arbeit haben EATON und KLAASSEN (20) die Aufnahme von Strophanthin in isolierte Leberzellen beschrieben. Sie zeigten, daß die Aufnahme sättigbar, energieabhängig und durch Gallensäuren hemmbar ist. Die angewendeten Konzentrationen lagen zwischen 10 uM und 1 mM. Die für die Pharmakologie interessanten Verhältnisse bei niedrigen Blutplasma-Konzentrationen (20 nM) wurden von ihnen nicht aufgeführt. Auch fehlen Aussagen über die Differenzierung zwischen Membranbindung und Membrantransport von Strophanthin. Zwar wurde der Einfluß von 31 Pharmaka und Steroiden, darunter auch Digitoxin und Taurocholat, untersucht, jedoch wurde gerade zu der wichtigen Frage, ob die beobachtete Hemmung kompetitiv war, keine Stellung bezogen. Dies war für uns der Anlaß, weiterführende Untersuchungen zur Aufnahmekinetik durchzuführen. Darüber hinaus wurden Studien zur Aufnahme von Digitoxin mit-

einbezogen, um Hinweise für die molekulare Grundlage der unterschiedlichen Pharmakokinetik beider Herzglykoside zu erhalten.

1. Was spricht für eine Aufnahme in die Zelle?

Strophanthin wird an die (Na^++K^+)-ATPase von Zellen und isolierten Membranen zum Teil mit sehr hoher Aktivität gebunden, und man kann annehmen, daß der pharmakologische Effekt durch diese Bindung verursacht wird. Als Folge dieser Bindung wird die (Na^++K^+)-ATPase gehemmt; dabei ist auffällig, daß zur Hemmung der (Na^++K^+)-ATPase durch Strophanthin in verschiedenen Spezies unterschiedlich hohe Konzentrationen notwendig sind, z.B. im Erythrozyten oder Herz beim Menschen etwa 10^{-9} molar (38) und an der Leberzellmembran der Ratte ungefähr 2×10^{-4} molar (SCHWENK unveröffentlicht). Die Bindung vom Strophanthin an die (Na^++K^+)-ATPase ist in Abwesenheit von K^+ etwa 10 mal stärker als in Anwesenheit von K^+ (48). Sie erfolgt an Erythrozyten überraschend langsam mit einer Halbwertszeit von mehreren Minuten (49). Über die Geschwindigkeit der Bindung an die Leberzellmembranen ist bisher nichts bekannt. Es wäre möglich, daß sie ebenfalls langsam erfolgt, und daß das, was wir als Aufnahme interpretiert haben, in Wirklichkeit eine langsame Membranbindung ist. Es könnte aber auch sein, daß sowohl Membranbindung als auch Aufnahme stattfindet oder die Membranbindung verschwindend klein ist. Im folgenden sollen zunächst Argumente und Hinweise aufgezeigt werden, die für eine wirkliche Aufnahme in den intrazellulären Raum sprechen.

1.1. Ausstrom von Strophanthin nach Zellschädigung

Ein mehrmaliges Hintereinander-Pipettieren der Zellen führte zu einer raschen Erniedrigung der Menge an Strophanthin, die mit den Zellen sedimentierte (vgl. Abb. 19). Es ist wohl kaum wahrscheinlich, daß eine mechanische Schädigung zur Ablösung von membrangebundenem Material führt; dagegen wird sicher nach die-

ser Zellschädigung ein Teil des intrazellulär aufgenommenen Strophanthins durch die entstandenen Membranlücken nach außen strömen. Daraus kann man schließen, daß der überwiegende Teil des Strophanthins tatsächlich in das Zellinnere aufgenommen wurde.

1.2. Energieabhängigkeit

Die Bindung von Strophanthin an die (Na^++K^+)-ATPase ist nur in geringem Maße abhängig von der Anwesenheit von ATP. Die Aufnahme von Strophanthin in isolierte Leberzellen ist dagegen stark energieabhängig. Die aufgenommene Menge an Strophanthin läßt sich durch metabolische Hemmer um 93% erniedrigen (vgl. Abb. 10), analog zu bekannten Membrantransporten (42 - 47). Es liegt der Schluß nahe, daß die metabolische Energie für den Transport benötigt wird, um eine Aufnahme in den intrazellulären Raum gegen ein Konzentrationsgefälle zu gewährleisten.

1.3. Berechnung der Zahl hypothetischer Bindestellen

Am Beispiel der Aufnahme von 200 uM Strophanthin in Abb. 2 sollen zunächst einige aufschlußreiche Berechnungen vorgenommen werden. Nach 21 min sind 34% des Strophanthins in die Zellen aufgenommen worden, dies entspricht einer Menge von 12 nMol/mg Protein. Da das wässrige Volumen von 1 mg Zellprotein 3 ul entspricht, ist die intrazelluläre Konzentration 4 mM, gleichmäßige Verteilung auf das wässrige Volumen vorausgesetzt. Die extrazelluläre Konzentration ist auf 134 uM abgefallen. Dies entspricht einem Konzentrationsgefälle von 1 : 64 in die Zelle. Da 1 mg Protein etwa 2 200 000 Zellen enthält, kann man auch sagen, daß 10^8 Moleküle/1 Zelle aufgenommen werden. Interessanter noch ist ein Vergleich mit der zellulären Proteinmenge. Geht man davon aus, daß jedes Proteinmolekül im Mittel ein Molekulargewicht von 50 000 Dalton hat, dann enthält 1 mg Protein 20 nMol Protein. Nach Aufnahme von 12 nMol Strophanthin/20 nMol Protein stehen also jedem zellulären Protein 0,6 Moleküle Strophanthin gegenüber. Nimmt man nun weiter an, daß

10% des zellulären Proteins in die Zellmembran integriert sind, so kann die Zelle folglich 6 Moleküle Strophanthin/ 1 Molekül Zellmembranprotein aufnehmen. Dieser Vergleich macht erneut deutlich, daß der größte Teil des Strophanthins nicht an membranständige Rezeptoren gebunden sein kann, sondern tatsächlich in die Zelle aufgenommen wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5 Quantitative Beziehungen zwischen Zellmaterial und aufgenommenem Strophanthin (nach Berechnung im Text)

% aufgenommen	nMol Stroph. / mg Protein	Stroph. intrazell. (mM)	Molek.Stroph. / 1 Zelle	Molek.Stroph. / Molek.Zellprotein	Molek.Stroph. / Molek.Membranprotein
34	12	4	10^8	0,6	6

1.4. Metabolismus

Taurocholat, das mit Strophanthin um die Aufnahme kompetiert, wird intrazellulär rasch konjugiert. Dies ist ein Beweis für eine echte Aufnahme. Analog kann man vermuten, daß auch Strophanthin, das bei der Ratte nicht metabolisiert wird, in den Intrazellulärraum aufgenommen wird.

2. Gibt es Hinweise für eine Membranbindung?

Die zelluläre Aufnahme der amphiphilen Gallensäure Taurocholat ist von einer unspezifischen Bindung an die Membran überlagert, die innerhalb von 15 sec ein Maximum erreicht (21) und sich im Aufnahmediagramm als Sockelbetrag auf der Y-Achse darstellt. Bei der Strophanthin-Aufnahme dagegen wurde, wie Abb. 2 zeigt, kein Sockelbetrag gefunden. (Der

Sockelbetrag, der bei EATON und KLAASSEN (20) für die Strophanthin-Aufnahme dargestellt ist, ist ein Artefakt, der aus dem Versuch herrührt, den nicht-linearen zeitlichen Verlauf der Aufnahme durch eine Gerade darzustellen. Damit erlauben die Aufnahmekurven keine Unterscheidung zwischen den zwei verschiedenen Prozessen, nämlich der Bindung und der Aufnahme. Auch Versuche, die Aufnahme und spezifische Bindung bei ganzen Zellen durch Variation des pH, der Temperatur oder der extrazellulären K^+- Konzentration unterschiedlich zu beeinflussen, blieben ohne Erfolg.

Dagegen war bei Verwendung isolierter Leberzellmembranen eine geringe Membranbindung von Strophanthin meßbar; allerdings war die Bindung nicht sättigbar. Eine spezifische Bindung von Strophanthin an die Leberzellmembran konnte auch funktionell nachgewiesen werden durch Hemmung der (Na^++K^+)-ATPase (50). Diese Bindung hatte eine niedrige Affinität; die ATPase wurde bei 800 uM halbmaximal gehemmt.

Auf Grund der vorliegenden Daten kann ausgeschlossen werden, daß die gemessene Aufnahme vorwiegend eine Membranbindung und einen wesentlichen Beitrag zur Aufnahme leistet. Das wirkliche Ausmaß der Membranbindung konnte jedoch nicht erfaßt werden.

II. WELCHE AUSSAGEN SIND ÜBER DEN TRANSPORTMECHANISMUS MÖGLICH?

Wenn man davon ausgeht, daß die gemessene Aufnahme vorwiegend ein Membrantransport ist, so handelt es sich um einen aktiven, vermittelten Transport. Der molekulare Mechanismus eines aktiv-vermittelten Transportes läßt sich modellhaft in 3 einzelne Reaktionsschritte untergliedern (vgl. schematische Darstellung in Abb. 29): Bindung an die Rezeptorstelle eines Transportproteins, Translokation des Protein-Substrat-Komplexes durch

die Membran und schließlich Dissoziation des Komplexes an der Innenseite der Membran. Im folgenden soll diskutiert werden, welche Aussagen auf Grund der vorliegenden Ergebnisse zu den einzelnen Reaktionsschritten möglich sind.

1. Rezeptorbindung

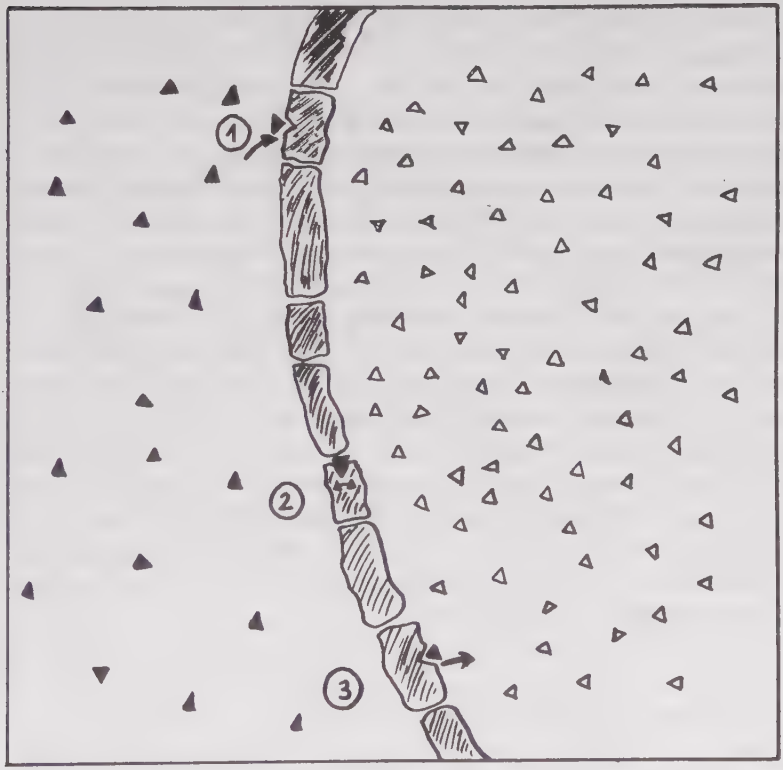
Der erste Schritt, die Anlagerung von Strophanthin an das Transportprotein, könnte dann untersucht werden, wenn diese Bindung im Verhältnis zur Translokation sehr schnell wäre. Wie bereits erläutert, konnte eine Bindung an Rezeptoren der Membran bei Verwendung ganzer Zellen nicht gemessen werden. Jedoch kann man Aussagen über die Bindespezifität des Carriers für verschiedene Substrate machen: der Carrier kann keine einfachen Zuckermoleküle binden, aber sowohl lipophile (Digitoxin) als auch anionische Steroide (Taurocholat) anlagern.

2. Translokation

Der zweite Schritt betrifft die Translokation eines wasserlöslichen Moleküls durch die lipophile Membran. Man darf annehmen, daß die Rezeptorstelle für Strophanthin von einem hydrophilen Proteinbereich umgeben ist, welche sich mit einer geringen Aktivierungsenergie innerhalb der Membran bewegen kann. Zur Aufklärung der dabei notwendigen Konformationsänderungen können die vorliegenden Untersuchungen keinen Beitrag leisten. Sie erlauben aber Spekulationen darüber zu machen, ob der vermittelte Transport reversibel ist oder nicht. Das Experiment der Abb. 19 hat gezeigt, daß die Aufnahme einer extrazellulären Menge von Strophanthin dann 2-3 mal schneller erfolgt, wenn die Zellen bereits eine große Menge Strophanthin enthalten. Dieser überraschende Befund steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Anionentransportes an Erythrozyten (51) oder des ADP/ATP-Austausches bei Mitochondrien (52). Jedoch besteht

Abb. 29 schematische Darstellung zum Transportmechanismus wie er in Abb. 18 beschrieben ist

1. Bindung an die Rezeptorstelle
2. Translokation
3. Dissoziation an der Membraninnenseite



Nach diesem Modell, wie zur Abb. 18 diskutiert, kann der Carrier Substratmoleküle sowohl von innen nach außen als auch umgekehrt transportieren. Die Wahrscheinlichkeit, daß die mit Substrat besetzte Rezeptorstelle über die Membran wandert, ist größer als für den unbesetzten Rezeptor.

beim Transport des ungeladenen Strophanthins im Gegensatz zu den beiden anderen Transportsystemen nicht die Notwendigkeit eines Gegentransportes für den Ladungsausgleich. Deshalb ist unwahrscheinlich, daß der Befund durch eine strikte Austauschdiffusion des Strophanthins zustande kommt. Eine mögliche andere Erklärung bestünde darin, daß der Carrier einerseits reversibel transportiert, andererseits der Carrier-Substrat-Komplex leichter durch die Membran permeieren kann als der Carrier allein. Das würde bedeuten, daß der Rezeptor intrazellulär immer schnell besetzt wird und nach der Permeation und Ablösung des nach außen transportierten Strophanthin-Moleküls die Bindestellen für die Aufnahme bereit hält. In Übereinstimmung mit diesem Modell steht der Versuch aus Abb. 18, in dem Zellen mit wenig radioaktivem Strophanthin beladen wurden und dann die Zugabe einer größeren Menge unmarkiertes Strophanthin zu einem Ausstrom von unmarkiertem Strophanthin führte. Es ist wichtig, daß bei diesem Experiment die Strophanthinkonzentration beträchtlich unter dem K_m-Wert für die Aufnahme lag, da Konzentrationen, die zu einer Sättigung führen, auch ohne Reversibilität des Transportes eine Umverteilung der Radioaktivität bewirken können. So würde nämlich die hohe Dosis an Strophanthin ähnlich wirken wie ein Hemmer der Aufnahme, z.B. Antimycin A. Ob Taurocholat zu einem Ausstrom führt, weil es nach der Aufnahme einen freien Rezeptor an der Membraninnenseite zurückläßt, oder ob es in das bestehende Gleichgewicht von In- und Eflux von Strophanthin durch Hemmung der Aufnahme eingreift, was einen erhöhten Ausstrom von radioaktivem Strophanthin zur Folge hat, kann nicht entschieden werden.

3. Dissoziation des Komplexes

Informationen über den dritten Schritt, die Dissoziation des Komplexes, konnten mittels dieser Experimente nicht erhalten werden.

4. Ursachen der Akkumulation

Die Berechnung auf Seite 51/52 hatte ergeben, daß Strophanthin mehr als 60-fach in der Zelle akkumuliert. Die Bindung von Strophanthin an zelluläre Strukturen (ca. 10%) trägt nur wenig zur Akkumulation bei. Die Erniedrigung der Akkumulation durch Antimycin A um 95% weist darauf hin, daß es sich um einen aktiven Transport handelt.

Auch Taurocholat wird in die Leberzelle aufgenommen. Jedoch besteht ein wesentlicher Unterschied darin, daß die Strophanthinaufnahme nicht Na^+-abhängig ist. Ein Vergleich der Aufnahmecharakteristika beider Steroide ist in Tabelle 6 dargestellt. Da Taurocholat ein Anion ist, wird hier vermutet, daß nicht wie beim Glucosetransport im Darm (34) der Na^+-Gradient als Energiequelle dient, sondern daß Na^+ als Kation für den Cotransport der Gallensäure besonders günstig ist. Denn gegen eine Na^+-Gradienten-Hypothese für den Taurocholat-Transport spricht, daß metabolische Hemmer den Transport viel schneller beeinflussen (in Sekunden, siehe SCHWARZ et al.), als den Na^+-Gradienten (in Minuten, siehe SCHULER et al.). Weiter wird angenommen, daß die energetische Kopplung sowohl für Taurocholat, als auch für Strophanthin über einen gemeinsamen Mechanismus, wie z.B. Phosphorylierung eines Membranproteines (34) erfolgt. Eine alternative Interpretation zur Na^+-Abhängigkeit gaben ANWER und HEGNER (46), die für die Gallensäureaufnahme zwei Transportsysteme annehmen: ein Na^+-abhängiges und ein Na^+-unabhängiges Transportsystem. Nach diesem Modell würde Strophanthin nur über das Na^+-unabhängige System aufgenommen.

Mit diesem letzten Modell könnte auch erklärt werden, warum die Aufnahme von Strophanthin durch Taurocholat kompetitiv, die Aufnahme von Taurocholat durch Strophanthin aber nicht kompetitiv gehemmt wird. Denn Taurocholat würde mit dem einzigen Strophanthincarrier konkurrieren, Strophanthin könnte aber nur den weniger leistungsfähigen Na^+-unabhängigen Taurocholattransport hemmen. Da allerdings nach den Befunden von ANWER und HEGNER der K_m-Wert des Na^+- unabhängigen Transportes von Taurocholat bei $\approx$100 uM liegt, ist nicht leicht einzusehen,

Tabelle 6 Vergleich der Aufnahme von Strophanthin und Taurocholat in isolierte Leberzellen

Die Ergebnisse für Strophanthin stammen aus dem Ergebnisteil dieser Arbeit. Die Befunde zur Taurocholat-Aufnahme wurden der Dissertation SCHWARZ, L. (1976) entnommen.

Parameter	Taurocholat	Strophanthin
K_m	(13,4 ± 3) uM	(239 ± 61) uM
v_{max}	(2,4 ± 0,8) nMol/mg Prot./ x min	(3,1 ± 1) nMol/mg Prot. x min
Hemmung durch Dinitrofluorbenzol	+	+
Hemmung durch Antimycin A	+	+
Hemmung durch Strophanthin	nicht kompetitiv $I_{50} \approx 62$ uM	-
Hemmung durch Taurocholat	-	kompetitiv K_i = 6,25 uM
Einfluß von Na^+	Na^+-abhängig	Na^+-unabhängig
extrazelluläres pH	Optimum im Physiologischen	kein Optimum
Aktivierungsenergie ΔE	(12 - 29) Kcal/Mol	23 Kcal/Mol

warum der Strophanthintransport schon bei viel niedrigeren Konzentrationen (62 uM) halbmaximal gehemmt wird.

Bei Annahme eines einzigen Carriers könnte das Ausbleiben einer kompetitiven Hemmung durch die viel geringere Affinität des Strophanthins zum Carrier erklärt werden; die nicht-kompetitive Hemmung der Taurocholat-Aufnahme wird vielleicht durch die Hemmung der (Na^++K^+)-ATPase hervorgerufen. Denn einerseits hemmt Strophanthin auch die Aufnahme von Nicht-Steroiden (53), andererseits werden für die Hemmung der (Na^++K^+)-ATPase und für die Hemmung des Taurocholat-Transportes ähnliche Strophanthin-Konzentrationen benötigt (etwa 800 uM).

5. Passive Abgabe von Strophanthin

Nach dem beschriebenen hypothetischen Modell der Translokation werden Aufnahme und Abgabe von Strophanthin vom gleichen Carrier katalysiert. Dies steht aber im Widerspruch zu dem Befund, daß alle gängigen Kriterien eines vermittelten Transportes für die Abgabe nicht zutreffen, und daß nur die Aufnahme durch Antimycin A, Dinitrofluorbenzol oder andere Steroide gehemmt wird. Der Grund für diesen markanten Unterschied (siehe Tabelle 7) könnte darin liegen, daß die Abgabe einen sehr hohen K_m-Wert hat, d.h. auch bei hohen intrazellulären Strophanthin-Konzentrationen nicht sättigbar ist und im Gegensatz zur Aufnahme nicht an energetische Prozesse gekoppelt ist. Vielleicht greift Antimycin A, auch Dinitrofluorbenzol, nicht am Carrier selbst, sondern bei der Energieübertragung ein und hemmt daher nur die Aufnahme.

Ein ganz wichtiges Ergebnis dieser Arbeit liegt in dem Befund, daß die Abgabe nicht energieabhängig ist. Dadurch unterscheidet sie sich klar von der Abgabe von Taurocholat, die energieabhängig, sättigbar und auch empfindlich gegen Dinitrofluorbenzol ist. Man darf aus diesem Befund schließen, daß trotz der Ähnlichkeiten bei der Aufnahme, nur Gallensäuren, nicht aber Herzglykoside aktiv aus der Leberzelle sezerniert

werden können. Der konzentrierende Schritt, der die hohe Strophanthin- Konzentration in der Galle (bei der Ratte) in vivo herstellt, liegt also nur auf der Seite der Aufnahme. Obgleich die isolierte Leberzelle ihre morphologische Polarität verloren hat, nehmen wir an, daß der Carrier für die aktive Aufnahme ursprünglich auf der sinusoidalen Seite der Zelle lokalisiert war, weil diese funktionell der richtige Ort ist, und weil eine aktive Aufnahme bei retrograder Verabreichung bisher nicht beobachtet wurde.

Tabelle 7 Vergleich der Wirkung verschiedener Effektoren auf die Aufnahme und Abgabe von Strophanthin
Alle Daten der Tabelle stammen aus dem Ergebnisteil der Arbeit.

Effektor	Aufnahme	Abgabe
Taurocholat	K_i = 6,25 uM	keine Hemmung
Antimycin A	I_{50} = 6 uM Antimycin A	"
2,4-Dinitrofluorbenzol	hemmbar	"
pH	geringe Abhängigkeit	keine Abhängigkeit
Temperatur	Aktivierungsenergie ΔE = 23 Kcal/Mol	Aktivierungsenergie ΔE = 5,40 Kcal/Mol

III. WARUM WERDEN STROPHANTHIN UND DIGITOXIN VERSCHIEDEN TRANSPORTIERT?

Trotz struktureller Ähnlichkeiten von Strophanthin und Digitoxin waren die Aufnahmecharakteristika beider Glykoside recht verschieden. Die Tabelle 3 bringt einen zusammenfassenden Ver-

gleich der Aufnahme von Strophanthin und Digitoxin. Es gibt nach diesen Resultaten keinen Hinweis für die Beteiligung eines Carriers bei der Aufnahme von Digitoxin. Die niedrige Aktivierungsenergie und der hohe Olivenöl/Wasser-Verteilungskoeffizient von Digitoxin weisen darauf hin, daß Digitoxin vorwiegend durch Diffusion in die Zelle gelangt. Ein kleiner Teil könnte allerdings über den Strophanthincarrier aufgenommen werden; zumindest besteht eine Kompetition mit Strophanthin um den Rezeptor.

Die erheblich raschere Aufnahme von Digitoxin hat ihre Parallele in der viel effektiveren Aufnahme von Digitoxin im Darm. Obwohl eindeutige Befunde zum Mechanismus der intestinalen Resorption beider Glykoside bislang fehlen, kann man annehmen, daß das Digitoxin auf Grund seiner Lipophilität und nicht wegen der Beteiligung aktiver Transportvorgänge so effektiv aus dem Darm aufgenommen wird.

Leider können die vorliegenden Untersuchungen keinen direkten Beitrag zur Pharmakokinetik der Herzglykoside beim Menschen leisten, da einerseits Strophanthin nur beim Menschen, nicht aber in der Ratte metabolisiert wird und andererseits beim Menschen neben der biliären Elimination die renale Ausscheidung die Hauptrolle spielt (2).

IV. KÖNNTE ALKOHOL DIE PHARMAKOKINETIK VON HERZGLYKOSIDEN BEEINFLUSSEN?

Herzglykoside haben eine geringe therapeutische Breite; eine Beeinflussung der Pharmakokinetik könnte daher zu unwirksam niedrigen oder toxisch hohen Plasmaspiegeln führen. Zwar wird die Aufnahme von Strophanthin in isolierte Leberzellen durch Äthanol gehemmt, jedoch dürfte dies insofern kein therapeutisches Risiko darstellen, als Strophanthin meist nur für kurze Zeit und unter klinischer Beobachtung verabreicht wird. Wichtiger ist, daß die Aufnahme von Digitoxin in isolierte Leberzellen durch Äthanol nicht sichtbar gehemmt wird. Über mögliche Änderungen der Transporteigenschaften nach chronischer Expo-

sition können die Ergebnisse keine Auskunft geben.

Das Beispiel der 10%igen Aufnahmehemmung bei 1‰ Äthanol zeigt aber, daß Äthanol schon bei relativ niedrigen Konzentrationen ausgeprägte biologische Effekte aufweist.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Abschließend kann man sagen, daß die vorliegende Arbeit folgende wichtige neue Erkenntnisse erbrachte: Strophanthin wird in die Leberzelle über den gleichen Carrier aufgenommen wie Taurocholat (zu den kinetischen Daten vgl. dazu Tabelle 6). Der Zuckeranteil des Moleküls wird vom Carrier nicht erkannt. Außerdem kann der Carrier in beide Richtungen transportieren, aber nur für die Aufnahme besteht eine Energieabhängigkeit (ΔE = 23 Kcal/Mol); im Gegensatz zu der allgemeinen Annahme, daß energieabhängige Transportvorgänge in der Regel an einen Na^+-Gradienten gebunden sind, ist dies bei Strophanthin nicht der Fall (vgl. dazu Tabelle 3). Strophanthin wird in dem weiten Konzentrationsbereich von 10 nM bis 4 mM immer und ausschließlich von ein und dem selben Transportsystem aufgenommen.

Leberzellen sind nicht in der Lage, Strophanthin aktiv zu sezernieren, obwohl für Taurocholat ein solcher Prozess vorhanden ist (vgl. dazu Tabelle 7). Die Aktivierungsenergie beträgt, im Gegensatz zur Aufnahme, nur ΔE = 5,40 Kcal/Mol. Eine Hemmung der Abgabe durch Antimycin A und 2,4-Dinitrofluorbenzol, wie bei der Aufnahme, konnte nicht beobachtet werden (vgl. dazu Tabelle 2).

Digitoxin wird zwar vom Carrier gebunden, das Molekül wird aber auf Grund seiner hohen Lipophilität vorwiegend durch Diffusion in die Zelle aufgenommen (zu den kinetischen Daten vgl. dazu Tabelle 3 und 4).

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. Fränkel, A.: Zur Digitalistherapie. Über intravenöse Strophanthintherapie. Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 257, (1906).

2. Storz, H.: Quantitatives zur Wirksamkeit von Strophanthin. Klin. Wschr. 36, 124, (1958).

3. Kramer, M., Lauterbach, F.: Intestinal secretion of organic ions and drugs. Proceeding of the Fourth Workshops Conference Hoechst. Excerpta Medica Amsterdamm - Oxfort, (1977).

4. Damm, K.H., Grosshauser, A. and Erttmann, R.: Intestinal Transport of ^{3}H - Digitoxin in vitro incompatible with simple diffusion. Naunyn - Schmiedeberg's Pharmacol. 289, 217 - 227, (1975).

5. Lauterbach, F.: Metabolismus und enterale Resorption herzwirksamer Glykoside. Naunyn - Schmiedeberg's Arch. Pharm. exp. Path. 263, 26 - 39, (1969a).

6. Schmoldt, A., Benthe, H.F. and Grothe, W.: Digitoxin metabolism by rat liver microsomes. Biochemical Pharmacology Vol. 24 pp. 1639 - 1641. Pergamon Press 195.

7. Storstein, L. and Amlie, J.: Studies on digitalis. XII. Kinetic pattern of digitoxin metabolism in patients with biliary fistulas. Clinical Pharmacology and Therapeutics Vol. 21, No 6, 659 - 674, (1977).

8. Damm, K.H. and Ertmann, R.: Interaction of probenecid with digitoxin metabolism in rats. Toxicology and applied Pharmacology 33, 246 - 257, (1975).

9. Lauterbach, F.,Repke, K.: Die fermentative Abspaltung von D-Digitoxose, D-Cymarose und L-Theratose aus Herzglykosiden durch Leberschnitte. Naunyn - Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 238, 196 - 218, (1960).

10. Lauterbach, F., Repke, K.: Über den Anteil tierischer und mikrobieller Fermente an der Glykosidspaltung im Organismus. Naunyn - Schmiedeberg's Arch.exp. Path. Pharmakol. 240, 2, (1960).

11. Repke, K. et al.: Über Spaltung und Hydroxylierung von Digitoxin bei der Ratte. Naunyn - Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 237, 34 - 48, (1969).

12. Repke, K. und Mitarbeiter: Die Bis-und Mono-digitoxoside des Digitoxigenins und Digoxigenins: Metaboliten des Digitoxins. Naunyn - Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmakol. 237, 155 - 170, (1959).

13. Richards, L.D., Castle, M.C. and Lage, G.L.: Glucuronidation of Digitoxin and its derivates by rat and rabbit liver homogenates. Drug Metabolism and Disposition. Vol. 5, No 5, 469 - 473, (1977).

14. Plaa, G.L.: The enterohepatic circulation. Handbook of Experimental Pharmacology XXXVII/3 Chapter 63, 130 - 149, (1975).

15. Cox, E., Roxburgh,and Wright, S.E.: The metabolism of Ouabain in the rat. J. Pharm. Pharmacol. 11,535 - 547, (1959).

16. Farah, A.: On the Elemination of G-Strophanthin by the rat. J. Pharmacol. exp. Ther. 86, 248, (1946).

17. Kupferberg, H.J. and Schanker, L.S.: Biliary secretion of Ouabain-H^3 and its uptake by liver slices in the rat.. Amer. J. Physiol. 214, 1048 - 1053, (1968).

18. Kupferberg,H.J.: Inhibition of Ouabain-H^3 uptake by liver slices and its excretion into the bile and compounds having a steroid nucleus. Life Sci. 8, 1179 - 1185, (1969).

19. Dirk, K.F., Meijer, Roel, J.V., Scholtens, E.J. and Levine, W.G.: The influence of dehydrocholate on hepatic uptake and biliary excretion of ^{3}H-Taurocholate and ^{3}H-Ouabain. Drug Metabolism and Disposition, Vol. 4, No 1, 1 - 7, (1976).

20. Eaton, D.L. and Klaassen, C.D.: Carrier-mediated Transport of Ouabain in isolated Hepatocytes. The Journal of Pharmacology and exp. Ther, Vol. 205, No 2, (1978).

21. Schwarz, L.R., Burr, R., Schwenk, M. and Pfaff, E. and Greim, H.: Uptake of taurocholic acid into isolated rat - liver cells.Eur. J. Biochem. 55, 617 - 623, (1975).

22. Anwer, M.S., Kroker, R. and Hegner, D.: Cholic acids uptake into isolated hepatocytes. Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1477 - 1486, (1976).

23. Rao, G.S., Schultze-Hagen, K., Rao, M.L. und Breuer, H.: Kinetics of steroid transport through cell membranes: comparison of the uptake of cortisol by isolated rat liver cells with binding of cortisol to rat liver cytosol. Journal of Biochemistry, Vol. 7, pp. 1123 - 1129, (1976).

24. Rao, M.L., Rao, G.S. and Breuer,H.: Uptake of Estrone, Estradiol-17β and Testosterone by isolated rat liver cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol. 77, No 2, (1977).

25. Schwarz, L.R., Schwenk, M., Pfaff, E. and Greim, H.: Excretion of Taurocholate from isolated hepatocytes. Eur. J. Biochem. 71, 369 - 373, (1976).

26. Baur, H., Kasparek, S. und Pfaff, E.: Criteria of viability of isolated liver cells. Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 827 - 838, (1975).

27. Berry, M.N. and Friend, D.S.: High - yield preparation of isolated rat liver parenchym cells. J. Cell. Biol. 43, 506 - 520, (1969).

28. Szarkowska, L. und Klingenberg, M.: On the role of ubiquinone in mitochondria. Biochem. Z. 338, 674 - 697, (1963).

29. Estabrook, R.W.: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratios. Methods Enzymol. 10, 41 - 47, (1967).

30. Klingenberg, M. und Pfaff, E.: Means of terminating reactions. Methods Enzymol. 10, 680 - 684, (1967).

31. Lineweaver, H. und Burk, D.: The determination of enzyme dissociation constants. J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 - 666, (1934).

32. Semenza, G., Tannenber, M., Kessler, G., Toggenburger, and Wahlgren, L.: A possible common activation site in Na^+-driven transport systems, partial purification of the Na^+-dependent D-glucose transport system from small intestinal brush borders: Biochemistry of membrane transport. Edited by: Semenza, G. and Carafoli, E., FEBS - Symposion, No 42, 269 - 279, Springer Verlag (1977).

33. Dixon, M.: The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem. J. 55, 170 - 171, (1953).

34. Kimmich, G.A.: Activ suggar accumulation by isolated intestinal epithelial cells. A new model for sodium-dependent metabolite transport. Biochemistry 9, 3669 - 3677, (1970).

35. Arrhenius, S.A.: Über die Geschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. Z. Phys. Chem. 4, 226 - 248, (1889).

36. Schuler, B.: Transiente Calciumaufnahme an isolietrten Leberzellen der Ratte und ihre Beeinflussung durch das intrazelluläre Na^+/K^+-Verhältnis. Zulassungsarbeit Biologie, (1978).

37. Höfer, M.: Transport durch biologische Membranen - das Konzept der Trägerkatalyse. Verlag Chemie, Weinheim-New York, (1977).

38. Erdmann, E., Hasse, W.: Quantitative aspects of Ouabain binding to human erythrozyte and cardiac membranes. J. Physiol. 251 (3), 671 - 682, (1975).

39. Maddrey, W.C. and Boyer, J.L.: The acute and chronic effects of ethanol administration on bile secretion in the rat. Journal of Laboratory and Clinical Medicine 82, 215 - 225, (1973).

40. Birder, J., Zysset, T.: The liver quantitative aspects of structure and function. Third International Gstaad Symposion. Sept. 12 - 14, (1978).

41. Song, C.S., Rubin, W., Rifkind, A.B., Kappas, A.: Plasma membranes of the rat liver: isolation and enzymatic characterization of a fraction rich in bile canaliculi. J. Cell Biol. 41, 124, (1969).

42. Bucheder, F., Broda, E.: Energy dependent Zinc-transport. Eur. J. Biochem. 45, 556 - 557, (1974).

43. Tarshis, M.A., Migoushina, V.L., Panchenko, L.F., Fedotov, N.S. and Bourd, H.I. Eur. J. Biochem. 40, 171 - 175, (1973).

44. Le Cam, A. and Freychet, P.: Neutral amino acid transport. Characterization of the A and L system in isolated rat hepatocytes. J. of Biol. Chemistry, Vol. 252, No 1, Issue of January 10, pp. 148 - 156, (1977).

45. Krenning, E.P., Docter, R., Bernard, H.F., Visser, T.J. and Henemann: Active transport of Trijodothyronine (T_3) into isolated rat liver cells. FEBS Letters Vol. 91, No 1, 113 - 116, (1978).

46. Anwer, M.S. and Hegner, D.: Effect of Na^+ on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes. Hoppe - Seyler's Z. Physiol. Chem. 159, 181 - 192, (1978).

47. Horne, D.W., Briggs, W.T. and Wagner, C.: A functional active transport system for Methotrexate in freshly isolated hepatocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications Vol. 68, No 1, (1976).

48. Bodemann, H.: Factors modifying the action of internal sodium and external potassium on Ouabain binding to red cell membranes. Membranes and Disease, (1976).

49. Atsunobu, Y.: Association and dissociationrate constants of the complexes between various cardiac monoglycosides and Na^+,K^+-ATPase. Annals of the New York Academy of Sciences, Vol. 242, Part VI, (1974).

50. Schwenk, M.: Persönliche Mitteilung.

51. Passow, H., Pring, M., Legrum-Schuhmann, B. and Zaki, L.: The action of 2-(4'-amino Phenyl)-6-Methyl Benzene Thioazol-3,7'-Disulfonic Acid (APMB) on anion transport and the protein in bond 3 of the red blood cell membrane. Biochemistry of Membrane Transport. FEBS - Symposion No 42, (1977).

52. Pfaff, E.: Unspez. Permeabilität und spez. Austausch der Adeninnucleotide als Beispiel mitochondrialer Compartimentierung. Dissertation (1965).

53. Kimmich, G.A. and Randles, J.: A Na^+-independent, Phloretin-sensitive monosaccharide transport system in isolated intestinal epithelial cells. J. Membrane Biol. 23,57 - 76, (1975).

54. Baur, H. and Heldt, W.: Transport of hexoses across the liver-cell membrane. Eur. J. Biochem. 74, 397 - 403, (1977).

55. Heinz, E., Geck, P. and Pietrzyk, J.: Driving forces of amino acid transport in animal cells. Ann. N. J. Acad. Sci. 264, 428 - 441, (1976).

LEBENSLAUF

Am 17.7.1950 wurde ich, Thaddäus-Anton Wiedmann, als Sohn des Bäckermeisters Hermann Wiedmann und seiner Ehefrau Zita, geb. Haaga, in Neufra bei Riedlingen geboren. Nach 5 Jahren Grundschule in Neufra trat ich im Frühjahr '62 in das humanistische Gymnasium Riedlingen ein. Im Januar '68, nach siebenjähriger Schulzeit in Riedlingen, wechselte ich in das Jesuitenkolleg St. Blasien/Hochschwarzwald über. Dort legte ich im Juni '70 die Reifeprüfung ab. Zum 1.7.1970 erhielt ich die Einberufung zum 18-monatigen Grundwehrdienst. Nach meiner Entlassung im Dezember 1971 arbeitete ich als Krankenpflegehelfer bis zum Sommersemester 1972 im Kreiskrankenhaus Riedlingen. Zum Sommersemester '72 begann ich an der Universität Tübingen das Physikstudium, zunächst mit der Richtung 'Diplom' später 'Lehramt'. Im April '74 meldete ich mich zur Zwischenprüfung, die ich mit gutem Erfolg bestand. Im Rahmen meines Physikstudiums konnte ich außerdem die Vordiplomprüfung in Chemie für Diplomphysiker mit Erfolg ablegen; ferner nahm ich die Gelegenheit wahr, an fachfremden Kursen und Seminaren teilzunehmen und Leistungsnachweise zu erbringen. Zum Sommersemester '75 erhielt ich an der hiesigen Universität einen Medizinstudiumplatz und studiere seither Medizin. Am 25.3.77 bestand ich die ärztliche Vorprüfung. Den dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung bestand ich am 15.4.1981.

Seit Oktober '78 bin ich mit meiner Frau Ilselore verheiratet.